Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. E. H. Graul)
im Radiologiezentrum der Philipps-Universität Marburg
(Direktoren: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. E. H. Graul,
Prof. Dr. med. F. Heß)

ERYTHROCYTENMARKIERUNG MIT RADIOCHROM (^{51}Cr) - URSACHE UND BEDEUTUNG DER NICHTERYTHROCYTENGEBUNDENEN AKTIVITÄT

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

UWE-WINFRIED SCHMIDT
aus Kolberg/Ostseebad

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. E. H. Graul)
im Radiologiezentrum der Philipps-Universität Marburg
(Direktoren: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. E. H. Graul,
Prof. Dr. med. F. Heß)

ERYTHROCYTENMARKIERUNG MIT RADIOCHROM (^{51}Cr) - URSACHE UND BEDEUTUNG DER NICHTERYTHROCYTENGEBUNDENEN AKTIVITÄT

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

UWE-WINFRIED SCHMIDT
aus Kolberg/Ostseebad

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg am 27.1.1978
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof.Dr.med.F.Neurath
Referent: Prof.Dr.med.H.Kuni
Korreferent: Prof.Dr.phil.H.Klamberg

Meinen lieben Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546807_0010

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Definition und Erläuterung der verwendeten Ausdrücke	3
2.1	Markierung mit ^{51}Cr	3
2.1.1	Konventionelle Markierungsverfahren	3
2.1.2	Signetteverfahren	3
2.1.3	Vorkontaktzeit (VKZ)	4
2.1.4	Inkubationszeit (IKZ)	4
2.1.5	Nichtaustauschbares Radiochrom (NAT ^{51}Cr)	5
2.1.6	Nichterythrocytengebundenes Radiochrom (NE ^{51}Cr)	5
2.1.7	Erythrocytengebundenes Radiochrom (E ^{51}Cr)	5
3.	Methode	6
3.1	Verwendetes Material	6
3.2	Meßmethoden	8
3.2.1	NE ^{51}Cr	8
3.2.2	NAT ^{51}Cr	8
3.2.2.1	Direkte Messung des NAT ^{51}Cr	8
3.2.2.2	Restgehalt an austauschbarem ^{51}Cr	9
4.	Ergebnisse	10
4.1	Einfluß der Markierungsbedingungen auf NAT ^{51}Cr und NE ^{51}Cr	10
4.1.1	VKZ und IKZ	10
4.1.1.1	Vollblutinkubation	10
4.1.1.2	Seruminkubation	17
4.1.1.3	Hämolyse und Spritzenadsorption	19
4.1.2	Spezifische Aktivität des ^{51}Cr	25
4.1.3	Lagerzeit der ^{51}Cr-Chromatlösung	29
4.1.4	ACD-Puffer	29
4.1.5	Zusatz von Ascorbinsäure oder Aminosäuren	34
4.1.6	Tageszeit der Blutentnahme	39
4.1.7	Lagerung bis zur Reinjektion	41
4.2	Komponentenanalyse des NE ^{51}Cr	41
4.2.1	Physikalisch-chemische Komponententrennung	41
4.2.1.1	Elektrophorese	42
4.2.1.2	Ultrafiltration durch Vakuum-Dialyse	45
4.2.1.3	Äthanolische Fällung	45
4.2.1.4	Anionenaustauscher-Chromatographie	47

		Seite
4.2.2	Analogrechner-Analyse	59
4.2.3	In vivo-Verhalten	59
5.	Diskussion	62
6.	Zusammenfassung	85
7.	Verzeichnis der Abbildungen	89
8.	Verzeichnis der Tabellen	92
9.	Literaturverzeichnis	94

1. Einleitung

Gray und Sterling haben 1950 eine Markierungsmöglichkeit für Erythrocyten mit ^{51}Cr entdeckt (33, 35, 34, 95). In der Folgezeit wurden zahlreiche methodische Abwandlungen der Markierung mit ^{51}Cr angegeben (77, 82, 71, 94, 72, 1, 2, 48, 41). Ihnen gemeinsam ist das Ziel einer möglichst hohen Markierungsausbeute, verbunden mit einer möglichst geringen Beimengung nichterythrocytengebundenen Chroms (NE ^{51}Cr). Wenn überhaupt, wurde das NE ^{51}Cr durch Waschen der Erythrocyten vermindert, ein verhältnismäßig zeitraubendes, umständliches, die Erythrocyten nicht gerade schonendes und die Sterilität gefährdendes Verfahren. Ihrem routinemäßigen klinischen Einsatz waren deshalb besonders in der hämatologischen Notfalldiagnostik (z.B. Blutvolumenbestimmung in der Traumatologie) Grenzen gesetzt. Die in vivo Markierung hat bislang nur eine marginale Rolle gespielt. Die vorliegende Arbeit befaßt sich ausschließlich mit der in vitro Markierung. 1963 brachte die Ionenaustauscher-Schnellmarkierungsmethode nach Kuni et al. (61, 62) unter Verwendung des Schnellmarkierungsapparates "Signette" [1] und dem dazugehörigen Besteck [1] eine technisch wenig aufwendige Lösung (30). Es entfallen die Waschvorgänge mit ihren o.a. Nachteilen, so daß eine Verkürzung der Inkubation lohnte. Die Markierung patienteneigener Erythrocyten ist so innerhalb ca. 15 Minuten möglich. Die Technik des Ionenaustauscherverfahrens lenkte das Interesse direkt auf das NE ^{51}Cr als Qualitätsmerkmal, das bisher nur indirekt als lästige Folge mangelhafter Markierungsausbeute angesehen wurde und deshalb wohl keine besondere Beachtung fand. Dieses Interesse wird auch belegt durch die Arbeit von Seifert und Meßmer (91), die 1970 das NE ^{51}Cr unter Anwendung des Signette-Verfahrens unter verschiedenen, z.T. extremen Bedingungen, bestimmt haben. Bei der kritischen Ausein-

---

[1] Den Schnellmarkierungsapparat "Signette" und das dazugehörige Besteck liefert die Firma Medipha, Geislingen/Steige.

andersetzung mit den Methoden und Ergebnissen dieser Autoren wurde für uns u.a. die Bedeutung des NE ^{51}Cr als Ursache einer schlechten Markierungsausbeute deutlich. Wir haben uns deshalb entschlossen, die Problematik des NE ^{51}Cr systematisch zu bearbeiten.

2. Definition und Erläuterung der verwendeten Ausdrücke

Wichtige und häufig in der folgenden Arbeit verwendete Ausdrücke werden vorab wie folgt definiert:

2.1 Markierung mit ^{51}Cr

Unter Markierung verstehen wir hier den gesamten Vorgang beginnend mit der Bereitstellung der benötigten Reaktionspartner, ihrer Reaktionen miteinander und schließlich aller Maßnahmen, Reaktionspartner und -produkte wieder voneinander zu trennen, bis zu dem Zeitpunkt, zu dem die markierten Erythrocyten einer weiteren Verwendung zugeführt werden. Diese Zeit enthält charakteristische Abschnitte, die einer speziellen Bezeichnung bedürfen.

2.1.1 Konventionelle Markierungsverfahren

Sie bestehen aus folgenden Arbeitsgängen:

1. Blutentnahme mit Antikoagulantien, in der Regel ACD-Puffer.
2. (Gelegentlich) Zentrifugieren und Entfernen des Plasmas.
3. Hinzufügen von $Na_2{}^{51}CrO_4$ und "Inkubation" (s. 2.1.4).
4. (Gelegentlich) Hinzufügen von Ascorbinsäure.
5. (Meist) 1 bis 3 Waschvorgänge, bestehend aus Suspension in physiologischer Kochsalzlösung, Zentrifugation und Dekantieren.
6. Resuspension (gelegentlich im aufbewahrten Plasma oder) in physiologischer Kochsalzlösung.

2.1.2 Signetteverfahren

1. In die ACD-Puffer - Granulat enthaltende 2 ml - Plastikspritze des Schnellmarkierungsbesteckes werden zunächst 0,4ml in aqua pro injectione gelöstes $Na_2{}^{51}CrO_4$ aufgezogen.

2. Hinzuziehen von Patientenvollblut bis zur 2ml-Marke.

3. Eine etwa linsengroße Luftblase und mehrfaches Schwenken der Spritze bewirken danach eine gleichmäßige Durchmischung in der Inkubationsspritze.

4. Zum Abschluß der Inkubationszeit wird die 2ml-Plastikspritze nach Entfernen der Luftblase an das eine und die leere 2ml-Plastikspritze aus dem Spritzenbesteck an das andere Ende des Ionenaustauschers gesetzt. Der Schnellmarkierungsapparat, in den die Spritzen eingespannt sind, drückt gleichmäßig innerhalb von 3 Minuten das Blut durch den Ionenaustauscher.

5. Der Inhalt der Auffangspritze wird in ihr bis zur Reinjektion gelagert und ist das Endprodukt des Markierungsverfahrens (62).

2.1.3 Vorkontaktzeit (VKZ)

Sie beginnt mit der Vermischung des Radioindikators ($Na_2{}^{51}CrO_4$) und des Antikoagulans (ACD-Puffer) und endet mit dem Hinzufügen des Vollblutes. Sie wird bei konventionellen Verfahren durch eine entsprechende Reihenfolge der Arbeitsschritte vermieden. Beim Signetteverfahren wird sie inkaufgenommen, um eine praxisgerechte Konfektionierung des Besteckes zu ermöglichn.

2.1.4 Inkubationszeit (IKZ)

Die Zeit, während der die beiden Schlüsselreaktionspartner Vollblut und Natriumchromat miteinander reagieren können, nennen wir Inkubationszeit. Beim konventionellen Verfahren wird ihr Ende als der Zeitpunkt definiert, zu dem entweder die Ascorbinsäure hinzugesetzt oder der Waschvorgang eingeleitet wird. Beim Signette-Verfahren endet sie mit der Passage durch den Ionenaustauscher, wobei der Beginn

der Ionenaustauscherpassage in den Versuchsbeschreibungen als das Ende der Inkubationszeit definiert ist.

2.1.5 Nichtaustauschbares Radiochrom (NAT ^{51}Cr)

Es handelt sich um die Gesamtaktivität nach Passage des Ionenaustauschers (IAT) beim Signette-Verfahren. Sie setzt sich zusammen aus der erythrocytengebundenen (E ^{51}Cr) und der nichterythrocytengebundenen (NE ^{51}Cr) Aktivität. Das NAT ^{51}Cr wird als relatives Verhältnis der Gesamtaktivität nach Passage des IAT zur Gesamtaktivität vor Passage des IAT in Prozenten ausgedrückt.

2.1.6 Nichterythrocytengebundenes ^{51}Cr (NE ^{51}Cr)

Es stellt das Radiochrom dar, das im Endprodukt des Markierungsvorganges als nicht von den Erythrocyten aufgenommene Aktivität vorliegt. Das NE ^{51}Cr wird als relatives Verhältnis der nichterythrocytengebundenen ^{51}Cr-Aktivität zur gesamten Aktivität im Endprodukt in Prozenten ausgedrückt. NE ^{51}Cr bezeichnet damit dasselbe wie der von Seifert und Meßmer verwendete Ausdruck "freie Chromrate".

2.1.7 Erythrocytengebundenes ^{51}Cr (E ^{51}Cr)

Es stellt das Radiochrom dar, das im Endprodukt des Markierungsvorganges als erythrocytengebundene Aktivität vorliegt. Das E ^{51}Cr wird als relatives Verhältnis der erythrocytengebundenen ^{51}Cr-Aktivität zur Gesamtaktivität vor Passage des IAT in Prozenten ausgedrückt.

3. Methode

3.1 Verwendetes Material

Für den Großteil der Untersuchungen zur Abklärung von Ursache und Bedeutung der nichterythrocytengebundenen Aktivität unter verschiedenen physikochemischen und biologischen Bedingungen wurde folgendes Material verwendet:

1. Signette-Spritzenbesteck der Firma Medipha [1], bestehend aus:
   einer 2ml-Einmalspritze, strahlensterilisiert, mit ca. 25 mg ACD-Granulat gefüllt. Das ACD-Granulat besteht aus: Acidum citricum 0,5 g %,
   Dinatriumcitrat-Monohydrat 1,4 g % und
   Dextrose 1,5 g %, pH = 5,1
   einer 2ml-Einmalspritze, strahlensterilisiert, leer,
   1 Ionenaustauscherschlauch, PVC, 200 mm lang, 2,5 mm lichte Weite, 0,5 mm Wanddicke,
   Füllung: stark basischer Anionenaustauscher durchschnittlicher Vernetzung (8 % DVB) mit einer Siebzahl zwischen 20 und 50 mesh, wie z.B. Dowex 2 x 8.

   In konz. NaCl-Lösung wird der in aqua dest. gequollene IAT mit Cl-Ionen beladen. Der IAT wird anschließend zweimal in aqua dest. gespült und mit 0,9 g%iger NaCl-Lösung und 3,8 g%iger Natriumcitrat-Lösung (Verhältnis 5:1) aufgeschwemmt. Der IAT wird durch Sog in den PVC-Schlauch eingefüllt und dieser beidseitig mit je einem Glaswollpropfen verschlossen. Der IAT-Schlauch hat ein Totvolumen von ca. 0,3 ml.

---

[1] Medipha GmbH, 734 Geislingen/Steige

der Ionenaustauscherpassage in den Versuchsbeschreibungen als das Ende der Inkubationszeit definiert ist.

2.1.5 Nichtaustauschbares Radiochrom (NAT ^{51}Cr)

Es handelt sich um die Gesamtaktivität nach Passage des Ionenaustauschers (IAT) beim Signette-Verfahren. Sie setzt sich zusammen aus der erythrocytengebundenen (E ^{51}Cr) und der nichterythrocytengebundenen (NE ^{51}Cr) Aktivität. Das NAT ^{51}Cr wird als relatives Verhältnis der Gesamtaktivität nach Passage des IAT zur Gesamtaktivität vor Passage des IAT in Prozenten ausgedrückt.

2.1.6 Nichterythrocytengebundenes ^{51}Cr (NE ^{51}Cr)

Es stellt das Radiochrom dar, das im Endprodukt des Markierungsvorganges als nicht von den Erythrocyten aufgenommene Aktivität vorliegt. Das NE ^{51}Cr wird als relatives Verhältnis der nichterythrocytengebundenen ^{51}Cr-Aktivität zur gesamten Aktivität im Endprodukt in Prozenten ausgedrückt. NE ^{51}Cr bezeichnet damit dasselbe wie der von Seifert und Meßmer verwendete Ausdruck "freie Chromrate".

2.1.7 Erythrocytengebundenes ^{51}Cr (E ^{51}Cr)

Es stellt das Radiochrom dar, das im Endprodukt des Markierungsvorganges als erythrocytengebundene Aktivität vorliegt. Das E ^{51}Cr wird als relatives Verhältnis der erythrocytengebundenen ^{51}Cr-Aktivität zur Gesamtaktivität vor Passage des IAT in Prozenten ausgedrückt.

3. Methode

3.1 Verwendetes Material

Für den Großteil der Untersuchungen zur Abklärung von Ursache und Bedeutung der nichterythrocytengebundenen Aktivität unter verschiedenen physikochemischen und biologischen Bedingungen wurde folgendes Material verwendet:

1. Signette-Spritzenbesteck der Firma Medipha [1], bestehend aus:
   einer 2ml-Einmalspritze, strahlensterilisiert, mit ca. 25 mg ACD-Granulat gefüllt. Das ACD-Granulat besteht aus: Acidum citricum 0,5 g %, Dinatriumcitrat-Monohydrat 1,4 g % und Dextrose 1,5 g %, pH = 5,1
   einer 2ml-Einmalspritze, strahlensterilisiert, leer,
   1 Ionenaustauscherschlauch, PVC, 200 mm lang, 2,5 mm lichte Weite, 0,5 mm Wanddicke,
   Füllung: stark basischer Anionenaustauscher durchschnittlicher Vernetzung (8 % DVB) mit einer Siebzahl zwischen 20 und 50 mesh, wie z.B. Dowex 2 x 8.

   In konz. NaCl-Lösung wird der in aqua dest. gequollene IAT mit Cl-Ionen beladen. Der IAT wird anschließend zweimal in aqua dest. gespült und mit 0,9 g%iger NaCl-Lösung und 3,8 g%iger Natriumcitrat-Lösung (Verhältnis 5:1) aufgeschwemmt. Der IAT wird durch Sog in den PVC-Schlauch eingefüllt und dieser beidseitig mit je einem Glaswollpropfen verschlossen. Der IAT-Schlauch hat ein Totvolumen von ca. 0,3 ml.

---

[1] Medipha GmbH, 734 Geislingen/Steige

2. Natriumchromat (^{51}Cr), Injektionslösung:

Aktivitätskonzentration:	200 µCi/ml	1 mCi/ml	1 mCi/ml
Spezifische Aktivität:	10 mCi/mg Cr	120 mCi/mg Cr	226 mCi/mg Cr
gelöst in:	0,4 ml aqua bidest. [2]	5,0ml physiologische Koch salzlösung [3]	5,0ml physiologische Kochsalzlösung [3]

3. Zentrifuge [4]

4. Bohrloch-Szintillationskristall mit Zähler [5].

5. Curiemeter [6].

6. Eppendorf-Pipetten: 1000 µl, 500 µl, 20 µl, entsprechende Pipettenspitzen.

7. Meßgläschen mit Rundboden, Lamellenstopfen und Reißnagel [1] (zur Manipulation der Gläschen mit Magnetwerkzeug).

8. Schnellmarkierungsapparat (Signette) [1], der den Inhalt einer 2 ml-Einmalspritze in 3 min gleichmäßig ausdrückt.

9. Eigenblut. Der Hämatokrit in der Inkubationsspritze wurde in 14 Ansätzen mit 27 % bestimmt.

---

1) Medipha GmbH, 734 Geislingen/Steige

2) Firma Buchler und Co., Braunschweig

3) Firma Hoechst, Frankfurt

4) Typ Labofuge III der Firma Heraeus-Christ, 3360 Osterode (Harz)

5) Digitaler 2-Kanal-Gamma-Meßplatz mit automatischem Probenwechsel (für 300 Proben) BF 5300 Gammascint der Firma Berthold, Wildbad.
Telefunken-Probenwechsler MsStr 1102/1.
Digitaler Einkanalmeßplatz mit Spektrometer BF 207 (Berthold Frieseke) und Szintillationszähler Sz 50 U mit 2" Kristall.
Datenausgabe über Teletype.

6) Curiemeter: Mediac® Dose calibrator Nuclear-Chicago.

3.2 Meßmethoden

In diesem Abschnitt werden lediglich die Meßmethoden erläutert, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit in unserer Arbeitsgruppe zur Lösung spezieller Fragestellungen entwickelt worden sind.
Allgemein übliche Methoden werden im Ergebniskapitel an entsprechender Stelle kurz erläutert.

3.2.1 NE ^{51}Cr

In ein Meßgläschen wird zu 1 ml Phosphatpuffer [7] oder 1 ml physiologischer Kochsalzlösung 20 µl Blut aus der Auffangspritze hinzugefügt. Nach Aktivitätsmessung und Zugabe von 0,5 ml Phosphatpuffer wird 10 min zentrifugiert (Drehzahl 2500 Umdr./min, entsprechend einer relativen Zentripetalbeschleunigung von 1000 x g). 1 ml des Überstandes wird in ein weiteres Meßgläschen übertragen und wiederum die Aktivität gemessen. Die Meßzeit beträgt jeweils 1,0 Minute.
NE ^{51}Cr ergibt sich laut Definition aus:

$$NE\ ^{51}Cr = \frac{\text{Gesamtaktivität im Überstand} \cdot 100}{\text{Gesamtaktivität vor Zentrifugation}} \quad [\%]$$

Die Gesamtaktivität im Überstand ist das Produkt aus dem Nettowert der Zählrate in Imp./min und dem Faktor 1,52, der sich aus der Verdünnung des Ausgangsvolumens von 1 ml Phosphatpuffer mit den 20 µl Blut und den hinzugefügten 0,5 ml Phosphatpuffer ergibt.

3.2.2 NAT ^{51}Cr

3.2.2.1 Direkte Messung des NAT ^{51}Cr

Die 2ml-Einmalspritzen werden jeweils vor und nach IAT-Passage teils im Curiemeter, teils in geometrischer Abschwächung mit dem Bohrloch - Szintillationskristall mit Zähler (Abschwächungsfaktor 377,5) gemessen. Nach Abzug des Nullwertes wird

---

7) Phosphatpuffer pH 7,3. Bestell-Nr.: ORBN 44, (Lösungskonzentrat für 1000 ml); Behring-Werke, Marburg.

die Aktivitätsrelation in Prozenten berechnet.

3.2.2.2 Restgehalt an austauschbarem ^{51}Cr

Die Ionenaustauscherschläuche werden nach Vollblutpassage mit 5 ml aqua dest. gespült, in Stücke von je 1 cm Länge zerschnitten und der Aktivitätsgehalt der Spülflüssigkeit und der Einzelstücke gemessen. Der Ausstoß aus dem IAT-Schlauch wird einer erneuten Passage durch einen zweiten IAT-Schlauch unterzogen. Dieser zweite Schlauch wird wie der erste verarbeitet.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluß der Markierungsbedingungen auf NAT ^{51}Cr und NE ^{51}Cr

4.1.1 VKZ und IKZ

4.1.1.1 Vollblutinkubation

Tabelle 1 zeigt das NAT ^{51}Cr in Abhängigkeit von der IKZ und VKZ. Eine unterschiedliche VKZ scheint lediglich das Niveau des NAT ^{51}Cr, nicht aber seine Verlaufsdynamik in Abhängigkeit von der IKZ zu beeinflussen.

Tabelle 1: Abhängigkeit des NAT ^{51}Cr von IKZ und VKZ. Mittelwert aus je 3 Versuchsansätzen.

IKZ (min)	VKZ (min)		
	10	20	30
2,5	50,2	46,5	42,6
5,0	55,2	52,3	48,2
7,5	57,3	50,8	45,8
10,0	58,1	52,0	49,6
15,0	56,8	53,2	49,1
20,0	58,2	54,0	49,9
30,0	58,7	55,6	50,2
45,0	57,8	54,4	49,5
60,0	57,8	56,3	50,4
90,0	58,1	54,4	51,0
120,0	57,5	56,2	51,3

Abb. 1 zeigt die Abhängigkeit des NE ^{51}Cr von VKZ und IKZ. Die durchgezogenen Linien wurden auf der TR 440 des Rechenzentrums der Universität Marburg [1] in zwei Abschnitten berechnet:

---

1) Herrn Peter Zöfel danken wir für die Zuverfügungstellung der Auswerteprogramme und die freundliche Unterstützung bei ihrer Benutzung.

1. Zeitabschnitt IKZ 0 bis 20 min:
   Angleichung polynomer Regressionen durch den Operator Polreg.
   Ergebnis:
   VKZ 10 min y = Polynom 7. Grades p = 0,004
   VKZ 20 min y = Polynom 5. Grades p = 0,012
   VKZ 30 min y = Polynom 6. Grades p = 0,034

2. Zeitabschnitt IKZ 20 bis 120 min: einfache lineare Regression.
   Ergebnis:
   VKZ 10 min $y = -0{,}00724 \cdot x + 2{,}607$ p = 0,0008
   VKZ 20 min $y = -0{,}00937 \cdot x + 2{,}972$ p = 0,0006
   VKZ 30 min $y = -0{,}00981 \cdot x + 3{,}264$ p = 0,0001

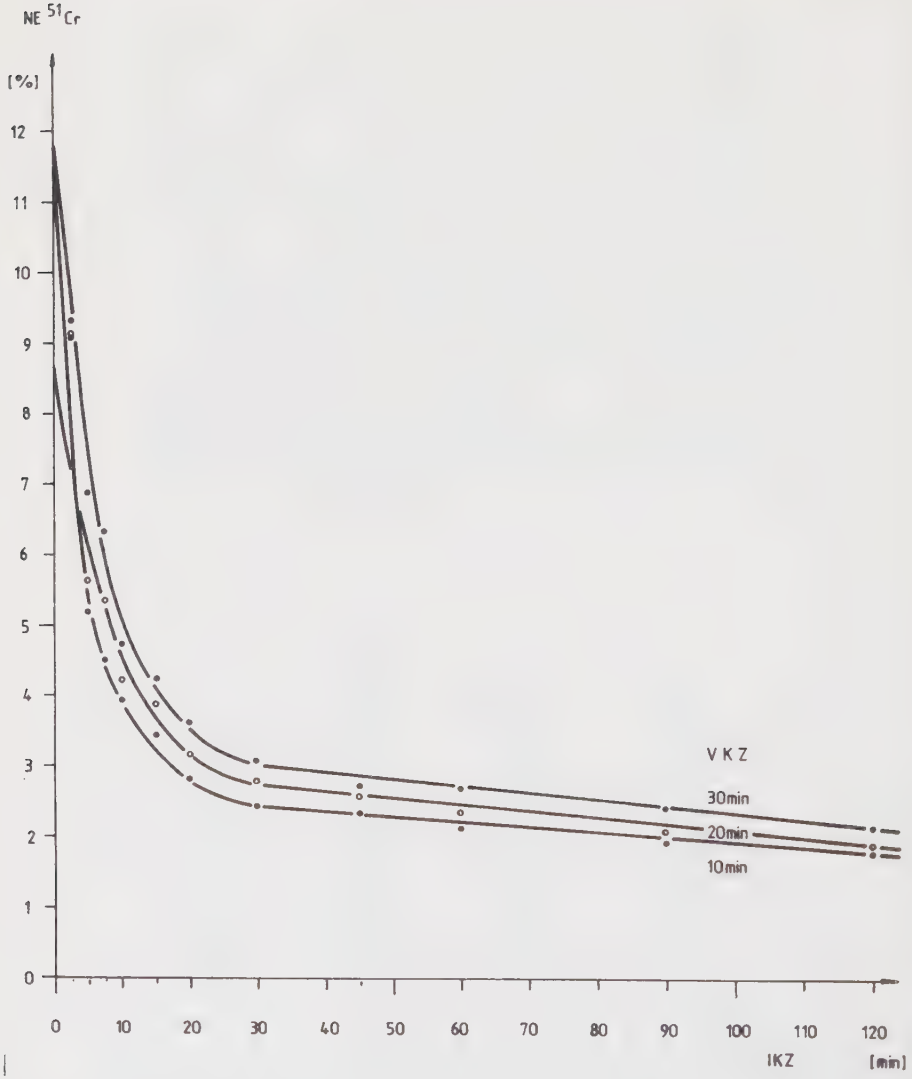


Abb. 1: Abhängigkeit des NE ^{51}Cr von IKZ und VKZ.
Durchgezogene Linien: berechnete Regressionen
(näheres s. Text)
Punkte: Mittelwerte aus durchschnittlich
8 Versuchsansätzen (mindestens jedoch 5)

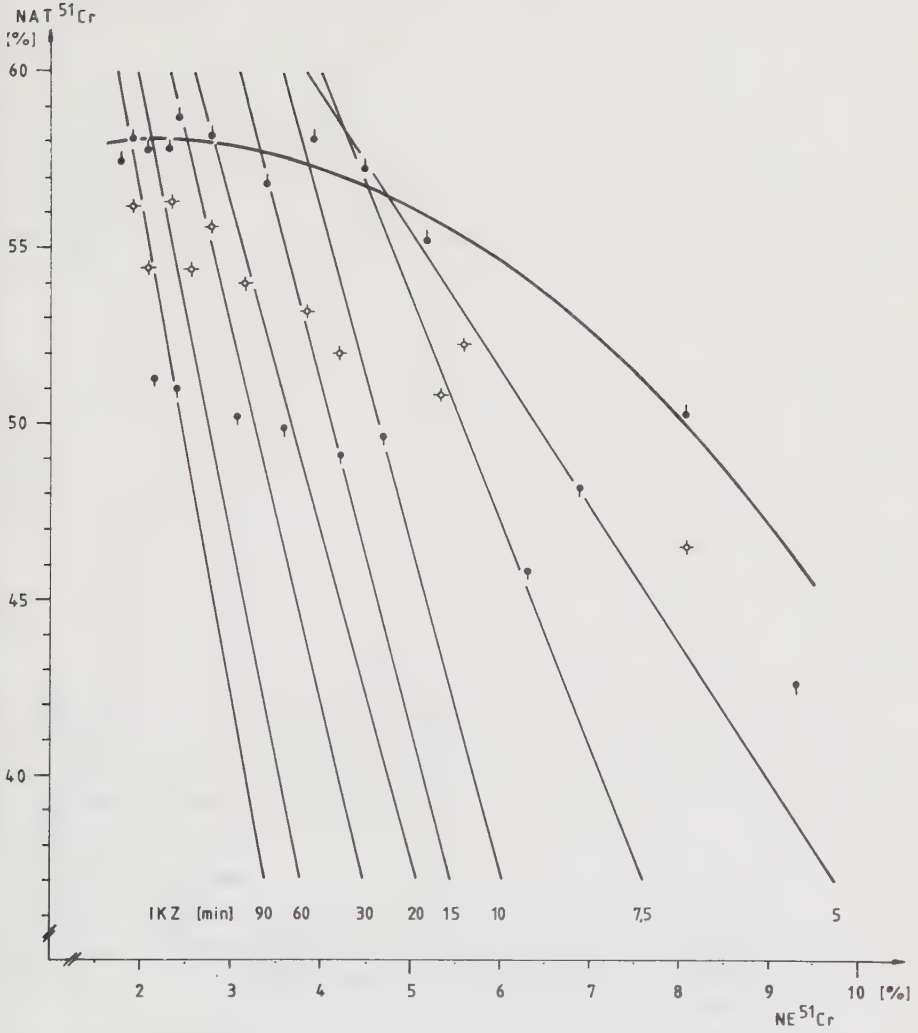


Abb. 2: Zusammenhang zwischen NAT ^{51}Cr und NE ^{51}Cr nach verschiedenen VKZ. ([•] VKZ 10 min, [✧] VKZ 20 min, [•] 30min) Als Kurve eingezeichnet polynome Regression 2. Grades (signifikant mit p = 0,05).
Dünne Geraden: Regressionsgeraden für alle Werte mit jeweils gleicher IKZ (näheres zu den Berechnungsmethoden s. Text).
Die zu einer IKZ von 2,5, 45 und 120 min gehörenden Geraden wurden wegen Extremabweichung nicht eingezeichnet (Parameter s. Text).
Punkte: Mittelwerte aus jeweils 3 Versuchen.

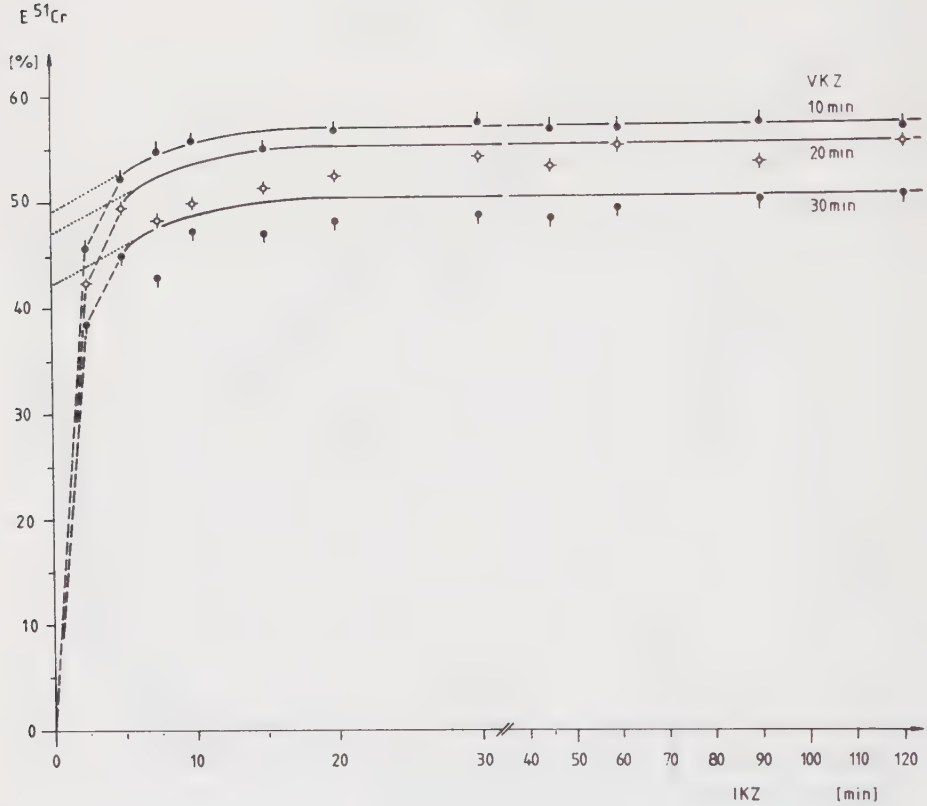


Abb. 3: Abhängigkeit des E ^{51}Cr (berechnet aus den in Tab. 1 und Abb. 1 gezeigten experimentellen Werten) von IKZ und VKZ.
Durchgezogene Kurven: mit Hilfe der in Abb. 4 gewonnenen Parametern konstruierte Exponentialfunktionen.
Gepunktet: Extrapolation dieser Kurven nach IKZ O min.
Gestrichelt: Polygonzug bis IKZ 5 min.
Punkte: Mittelwerte aus mindestens 3 Versuchen.

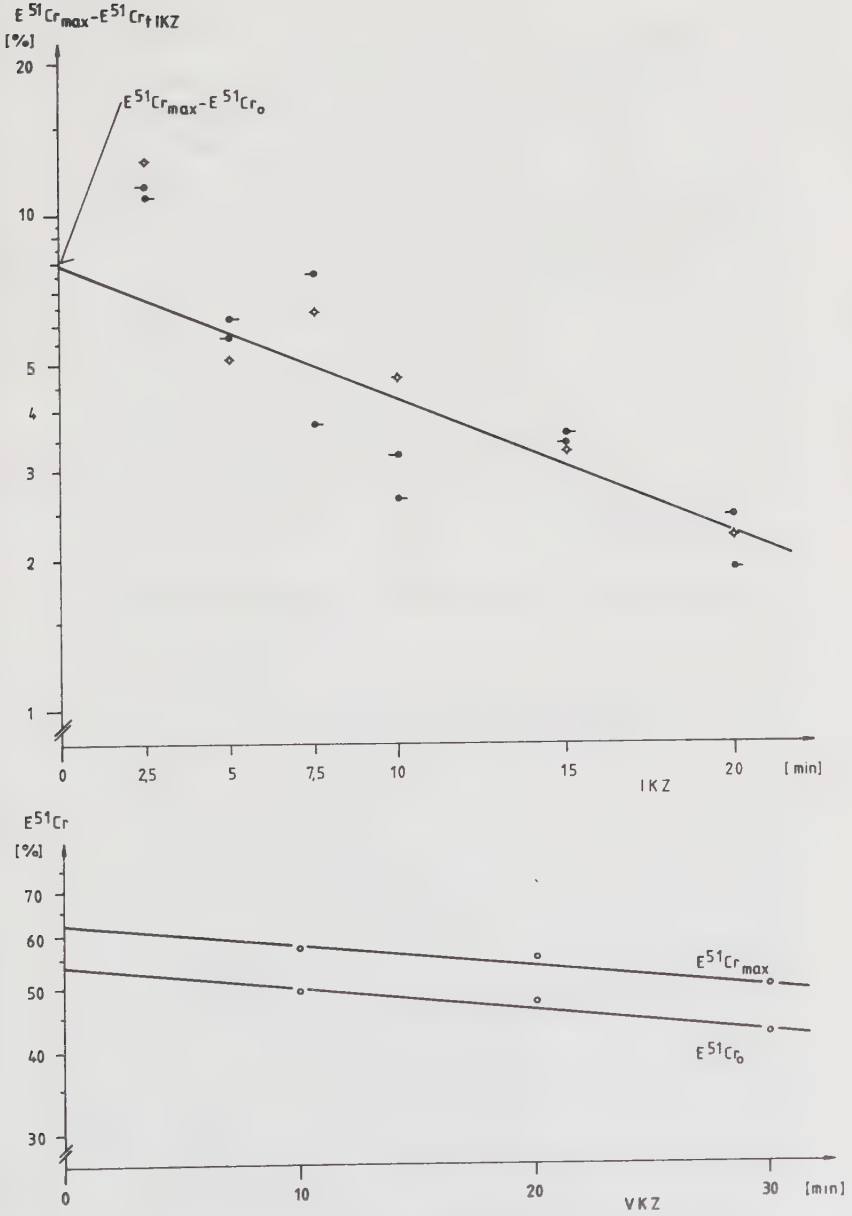


Abb. 4: (oben): Abhängigkeit der Differenz zwischen den E ^{51}Cr-Werten bei IKZ von 2,5 min bis 20 min und dem maximalen E ^{51}Cr-Wert von der IKZ. Eingezeichnet die lineare Korrelation für den ln der Differenzwerte (ohne IKZ 2,5 min). (unten): Rückextrapolation von E $^{51}Cr_o$ und E $^{51}Cr_{max}$ für VKZ O min.

Hervorzuheben sind:

1. Das höhere Niveau bei längerer VKZ.
2. Der innerhalb der Beobachtungsperiode signifikante Abfall des NE ^{51}Cr mit zunehmender IKZ.
3. Die stärkere Abnahme des NE ^{51}Cr mit zunehmender IKZ bei größerer VKZ.
4. Die Kurven bestehen aus mehreren Komponenten.

Eine gemeinsame Betrachtung von NE ^{51}Cr und NAT ^{51}Cr in Abhängigkeit von der IKZ zeigt, daß sie sich zwar prinzipiell gegensinnig verhalten, aber ohne festen linearen Zusammenhang. Eine Verlängerung der VKZ reduziert das NAT ^{51}Cr wesentlich markanter als es das NE ^{51}Cr vermehrt.
Aus den NAT ^{51}Cr- und NE ^{51}Cr-Werten berechneten wir

nach der Formel $E\ ^{51}Cr = \frac{NAT\ ^{51}Cr \cdot (100-NE\ ^{51}Cr)}{100}$

die E ^{51}Cr-Werte. Ihre Abhängigkeit von IKZ bei verschiedenen VKZ zeigt Abb. 3. Zur Konstruktion der exponentiellen Sättigungsfunktionen, mit denen wir den Kurvenverlauf beschreiben wollen, haben wir zunächst entsprechend Abb. 4 (oben) die Korrelation zwischen den Differenz-Werten E ^{51}Cr zu E $^{51}Cr_{max}$ und IKZ für jede VKZ getrennt berechnet. Da der Wert zu IKZ 2,5 min offensichtlich einheitlich dem Kurvenverlauf nicht entspricht, wurde er bei der Berechnung der Korrelationsgeraden weggelassen. Da sich die drei Korrelationsgeraden praktisch nicht unterscheiden, haben wir eine gemeinsame Gerade aus den Werten aller VKZ berechnet und der weiteren Kurvenkonstruktion zugrunde gelegt. Da offensichtlich für alle VKZ die exponentielle Sättigungsfunktion die gleiche Amplitude aufweist, läßt sich auf einfache Weise der E $^{51}Cr_{max}$-Wert für eine VKZ von O min extrapolieren (Abb. 4 unten).

4.1.1.2 Seruminkubation

Führt man diese Versuche mit Serum anstelle von Vollblut durch, kann sinnvollerweise nur das NAT ^{51}Cr gemessen werden.
Tabelle 2 läßt zwar einen Trend erkennen, nach dem bei einer IKZ von 10 min das NAT ^{51}Cr mit der VKZ zuzunehmen scheint, die Korrelation ist jedoch mit $r = 0,41$ nicht signifikant. Dagegen läßt sich eine signifikante Abnahme des NAT ^{51}Cr bei einer VKZ von 10 min mit zunehmender IKZ beweisen ($p < 0,05$). Der Wert für IKZ 5 min wurde in der Korrelationsberechnung fortgelassen, da er nicht nur vom Ergebnis her deutlich abweicht, sondern auch theoretisch sich in der Anfangszeit die Kurve aus dem O-Punkt entwickeln muß. (Abb.5, S.18)

Tabelle 2: Abhängigkeit des NAT ^{51}Cr von VKZ bei IKZ 10 min.

VKZ	2,5	5,0	7,5	10	15	20	30	45	120
NAT ^{51}Cr	8,45	8,66	9,45	8,12	8,87	8,37	9,99	9,86	9,32

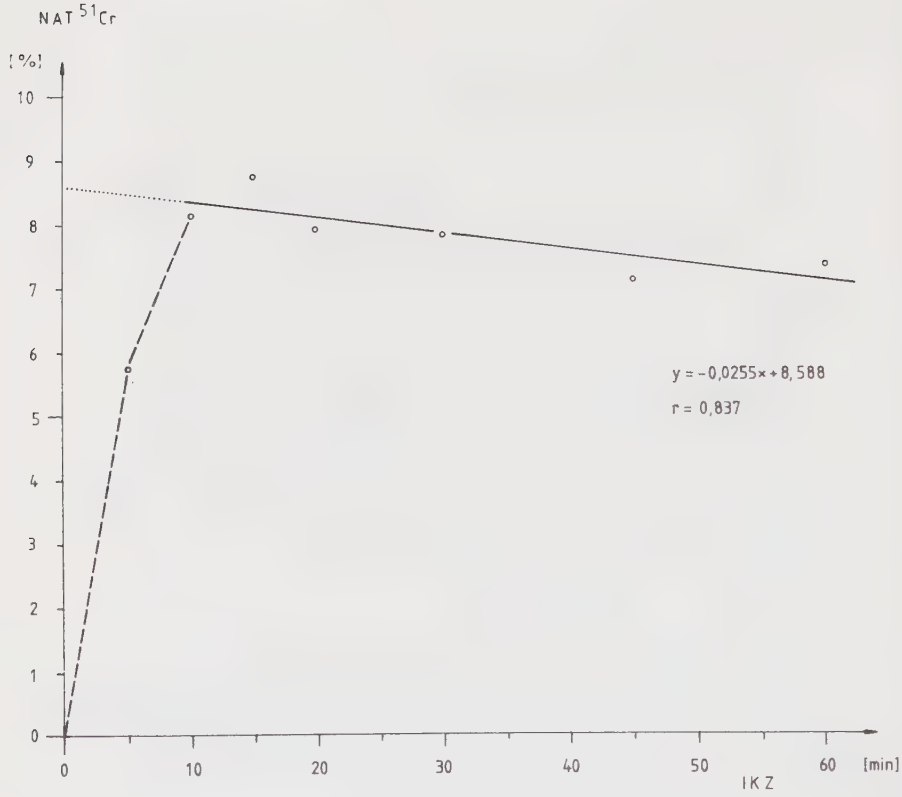


Abb. 5: Abhängigkeit des NAT ^{51}Cr von IKZ bei VKZ 10 min. Punkte: Einzelwerte. Regressionsgerade ohne Wert von IKZ 5 min. Gestrichelt: Polygonverbindung 0 bis 10 min.

4.1.1.3 Hämolyse und Spritzenadsorption

Sollte während der Markierung oder bei der Lagerung des markierten Präparates bis zur Reinjektion eine Alteration der Erythrocyten stattfinden, müßten das freiwerdende (markierte) Hämoglobin bzw. seine Derivate als Ausdruck für die Schädigung der Erythrocyten das NE ^{51}Cr erhöhen. Mehrere Versuchsansätze ergeben jedoch für das freie Hämoglobin Werte, die innerhalb der aus der Literatur bekannten Normalwertgrenzen liegen (83).

I. Verwendetes Material:

1. Spektralphotometer PM Q II [1)]
2. Modifizierte Drabkin-Lösung (83):
   50 mg Kalium-Cyanid, 200 mg Kalium-Ferricyanid, 140 mg Monokalium-Dihydrogenphosphat und 0,5 ml Sterox werden mit destilliertem Wasser auf 1000 ml verdünnt.
3. Phosphatpuffer [2)] bzw.
4. Physiologische Kochsalzlösung als Dekantierungsmedien

II. Versuchsdurchführung:

1. die freie Hämoglobinkonzentration (c) wird nach folgender Formel berechnet (57):

$$c = \frac{2\ E\ 415 - (\ E\ 380 + E\ 450\ )}{2\ \varepsilon\ Hb\ 415 - (\varepsilon\ Hb\ 380 + \varepsilon\ Hb\ 450)}\ [g/l]$$

   Die Erklärung liefert Abb. 6 (57), da zwischen Extinktion, Konzentration und Extinktionskoeffizient folgende Beziehung besteht:

$$c = \frac{E}{\varepsilon}$$

---

1) Carl Zeiss, Oberkochen/Württ.

2) Behring-Werke, Marburg, Best.Nr. ORBN 44.
Phosphat-Puffer (Lösung - Konzentrat für 1000 ml), pH 7,3.

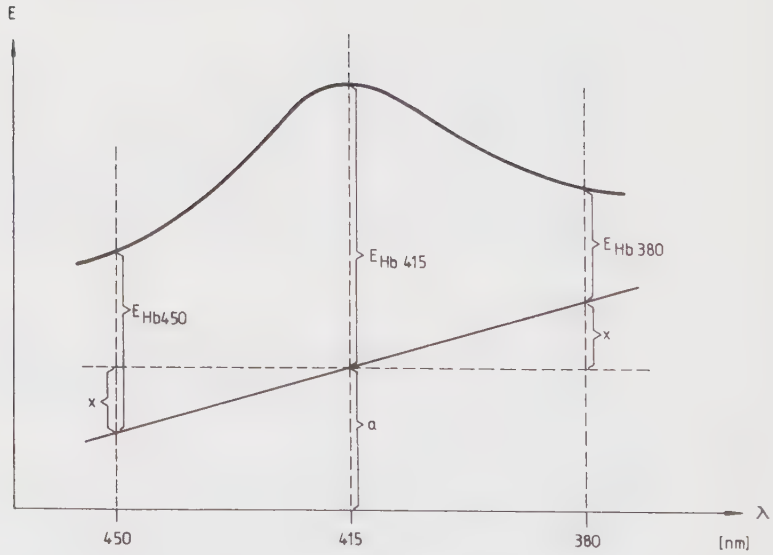


Abb. 6: Erläuterung der spektralen Extinktionsmessung des freien Hämoglobins in Drabkin-Lösung.
E = Extinktion
λ = am Monochromator eingestellte Lichtwellenlänge.
Die Methode beruht auf der Annahme, daß die Eigenextinktion des Serums bei 380 nm die Eigenextinktion a bei 415 nm um denselben Betrag x übersteigt, wie sie ihn bei 450 nm unterschreitet, und daß sich deshalb bei einer Subtraktion des Mittelwertes der E_{380} und E_{450} von E_{415} die Eigenextinktion des Serums eliminieren läßt.

2. Zur Berechnung des Extinktionskoeffizienten ε wird eine Verdünnungsreihe bekannter Hämoglobinkonzentrationen hergestellt. Die zugehörigen Extinktionen werden bei 380 nm, 415 nm und 450 nm gemessen.

3. Die Verdünnungsreihe wird von einem Ausgangshämolysat abgeleitet, dessen Hämoglobinkonzentration mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten nach folgender Formel berechnet wird:

$$\text{g Hämoglobin/100ml} = \frac{E(A) \cdot 16114}{11000} \cdot 10^{-1} \cdot \frac{5{,}02}{0{,}02} \quad (83).$$

Bei der Versuchsdurchführung wird nicht mit 0,02 ml Analysenvolumen, sondern mit 0,1 ml gearbeitet, so daß sich die Formel in

$$\text{g Hämoglobin/100ml} = \frac{E(A) \cdot 16114}{11000} \cdot 10^{-1} \cdot \frac{5{,}1}{0{,}1}$$

ändert. Daraus ergibt sich:

$$\text{g Hämoglobin/100ml} = E(A) \cdot 7{,}47.$$

Die Extinktion E(A) wird als Mittelwert aus drei Versuchen zu E = 0,499 ermittelt. Extinktionsmessungen wurden bei 540 nm durchgeführt.

Hämolysatherstellung:
2 ml Vollblut werden mit 4 ml aqua dest. hämolysiert und 20 min bei 5000 U/min (entsprechend einer relativen Zentripetalbeschleunigung von 2000xg) zentrifugiert. 0,1 ml Hämolysat aus dem Überstand werden mit 5,0 ml Drabkin-Lösung versetzt. Sie ergeben bei 540 nm eine mittlere Extinktion von E = 0,499.

Die Hämoglobinkonzentration des Ausgangshämolysates, gelöst in 5 ml Drabkin-Lösung, berechnet sich also zu: g Hb / 100 ml = 0,499 · 7,47 =
= 3,72 g Hb/dl =
= 37,2 g Hb/l

4. Die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten ε bei verschiedenen Verdünnungen erfordert eine Verdünnungsreihe bekannter Hb-Konzentration. Dazu wird die Ausgangslösung (0,1 ml Hämolysat + 0,5 ml Drabkin mit dem bereits berechneten Hb-Gehalt von 3,72 g/dl)in den Verhältnissen 1:200; 1:500 und 1:1000 verdünnt und die jeweiligen Extinktionen dieser Lösungen bei 380 nm, 415 nm und 450 nm gegen Drabkinlösung gemessen. Als Lösungsmittel dienen Phosphatpuffer und in einem Parallelansatz physiologische Kochsalzlösung. Vorversuche ergaben, daß die Eigenextinktionen sowohl des Phosphatpuffers wie auch der Drabkin- und der physiologischen Kochsalzlösung zu vernachlässigen sind.

   Aus den ermittelten Extinktionswerten zu jeder Konzentration wird der Faktor F nach folgender Formel errechnet:

$$F = \frac{2\,E_{415} - (E_{380} + E_{450})}{c} = \frac{\Sigma\,E}{c}$$

   Als Mittelwerte für F fanden wir
   F = 13,11 für Phosphatpuffer und
   F = 13,03 für physiologische Kochsalzlösung.

   Bei Anwendung der Methode ergibt sich die gesuchte Konzentration des freien Hämoglobins durch Umkehrung der obigen Formel mit Einsetzen von F und den Extinktionswerten. Die Messungen erfolgen bei Verdünnung 1:3 mit Phosphatpuffer.
   Die Ergebnisse zeigt Tab. 3.

   Tab. 3: Konzentrationen des freien Hämoglobins in mg/dl unter verschiedenen Versuchsbedingungen:

1. Plasma von unmarkiertem Citratblut	
1.1 ungestaut	4,00
1.2 2,5 min venöse Stauung	2,37
1.3 5 min venöse Stauung	2,00

2. Überstand von markiertem Blut nach IKZ von 20 min, IAT-Passage und

2.1 VKZ von 5 min	16,11
2.2 VKZ von 10 min	6,15
2.3 VKZ von 15 min	10,62
2.4 VKZ von 30 min	8,42

3. wie 2., jedoch IKZ von 10 min und VKZ von 10 min und

3.1 sofortige Verarbeitung	8,18
3.2 2-stündige Lagerung der Auffangspritze	9,65
3.3 3-stündige Lagerung der Auffangspritze	7,92

4. wie 3., jedoch Lagerung nach Verdünnung mit Phosphatpuffer 1:2 und

4.1 2-stündige Lagerung	2,28
4.2 3-stündige Lagerung	8,55
4.3 14-stündige Lagerung	4,65

Die Adsorption von ^{51}Cr an die Wandung der Inkubationsspritze wird gemessen, indem Spritzen nach Abschluß der VKZ bzw. der IKZ mit Leitungswasser gespült und ihre Restaktivität in einem transversalen Bohrloch in 4pi-Position gemessen werden. Abb. 7 zeigt, daß mit zunehmender VKZ die Aktivitäts-Adsorption der Inkubationsspritze deutlich zunimmt, jedoch nach Abschluß der IKZ auf 1/2 bis 1/7 sinkt. Zu beachten ist, daß auch der höchste beobachtete Wert weit weniger als 1 ‰ der Aktivität in der Inkubationsspritze ausmacht.

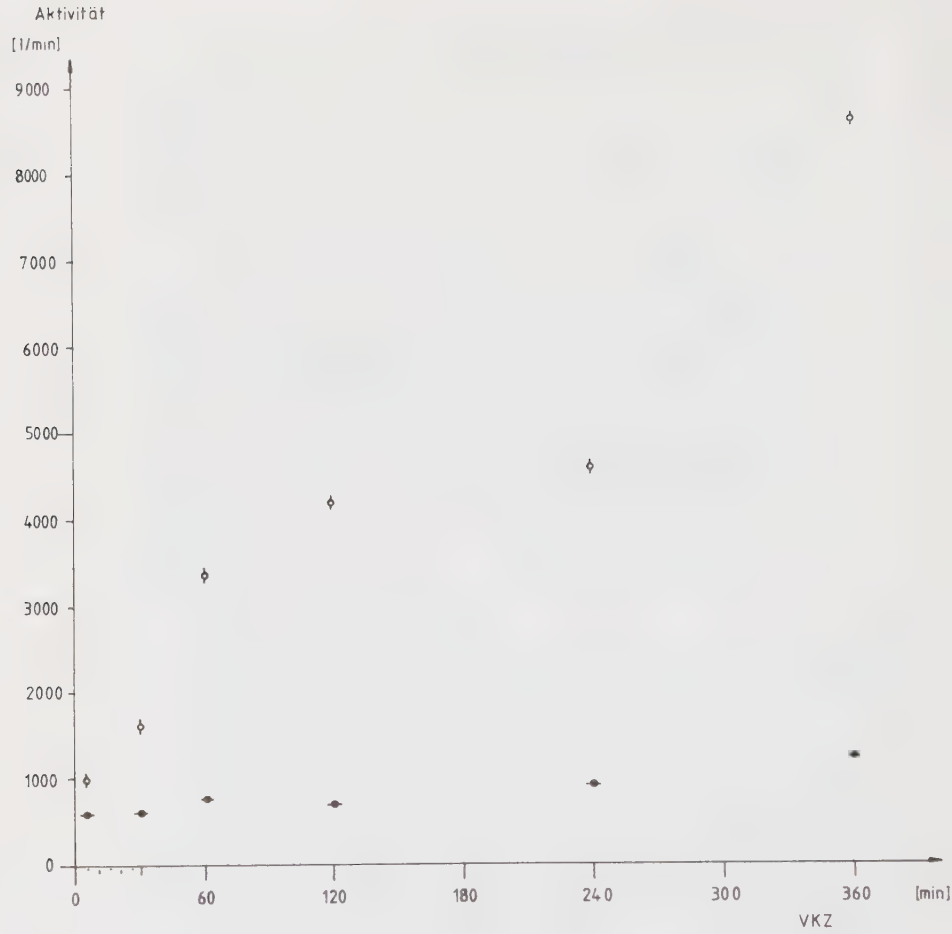


Abb. 7: Abhängigkeit der Aktivität gespülter Inkubationsspritzen von VKZ vor (♦) und nach (◆) einer IKZ von 20 min. (Mittelwerte aus jeweils 3 Versuchen).

4.1.2 Spezifische Aktivität des ^{51}Cr

Um den Einfluß verschieden hoher spezifischer Aktivitäten auf NAT ^{51}Cr sowie auf NE ^{51}Cr zu prüfen, werden einige Parallelansätze mit niedrigspezifischer Natriumchromatlösung (a) und hochspezifischen Natriumchromatlösungen (b und c) durchgeführt:

	a	b	c
spez. Aktivität:	10 mCi/mg Cr	120 mCi/mg Cr	226 mCi/mg Cr
Aktivitätskonzentration:	200 µCi/ml wässrige Lösung: 0,4 ml	1 mCi/ml Natriumchromat	1 mCi/ml in physiologischer NaCl - Lösung

Bei der Lösung a handelt es sich um ein Präparat, das speziell für das Signetteverfahren hergestellt wird. Die Lösungen b und c sind bei konventionellen Markierungsverfahren gebräuchlich.

Abb. 8 zeigt die Ergebnisse für NAT ^{51}Cr. Hervorzuheben ist, daß bei größeren spezifischen Aktivitäten das NAT ^{51}Cr mit wachsender VKZ rascher abnimmt und einen niedrigeren Endwert erreicht, aber eine direkte stöchiometrische Abhängigkeit scheint nicht zu bestehen.

Sinngemäß gilt diese Feststellung auch für die Zunahme des NE ^{51}Cr mit wachsender VKZ. Im untersuchten Bereich scheint das NE ^{51}Cr linear um so mehr zuzunehmen, je höher die spezifische Aktivität ist (Abb. 9). Eine direkte stöchiometrische Abhängigkeit scheint nicht zu bestehen. Eine Detailanalyse für das Verhalten des NE ^{51}Cr bei einer spezifischen Aktivität von 10 mCi/mg Cr für kleine VKZ (Abb. 9) ergibt, daß sich hier die Werte mit einer Exponentialfunktion an den weiteren linearen Verlauf anzunähern scheinen.

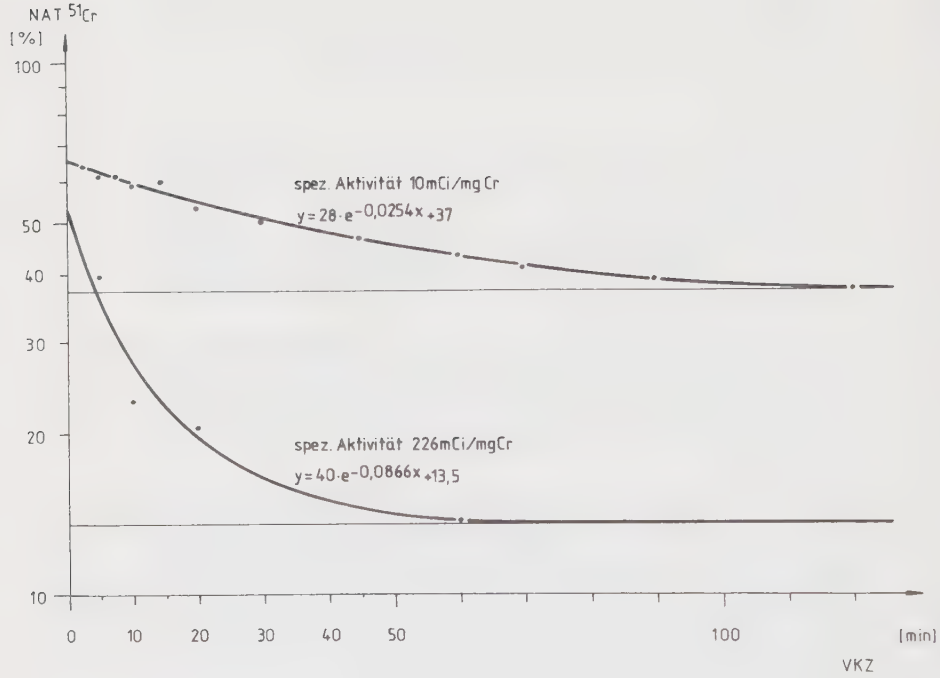


Abb. 8: Abhängigkeit des NAT ^{51}Cr von VKZ (IKZ jeweils 20 min) für eine spezifische Aktivität des ^{51}Cr von 10 mCi/mg Cr (als Metall) (oben, Punkte jeweils Mittelwerte aus 3 Versuchen) sowie von 226 mCi/mg Cr (unten, Punkte Einzelwerte). Die Parameter der eingezeichneten Exponentialfunktionen wurden graphisch ermittelt.

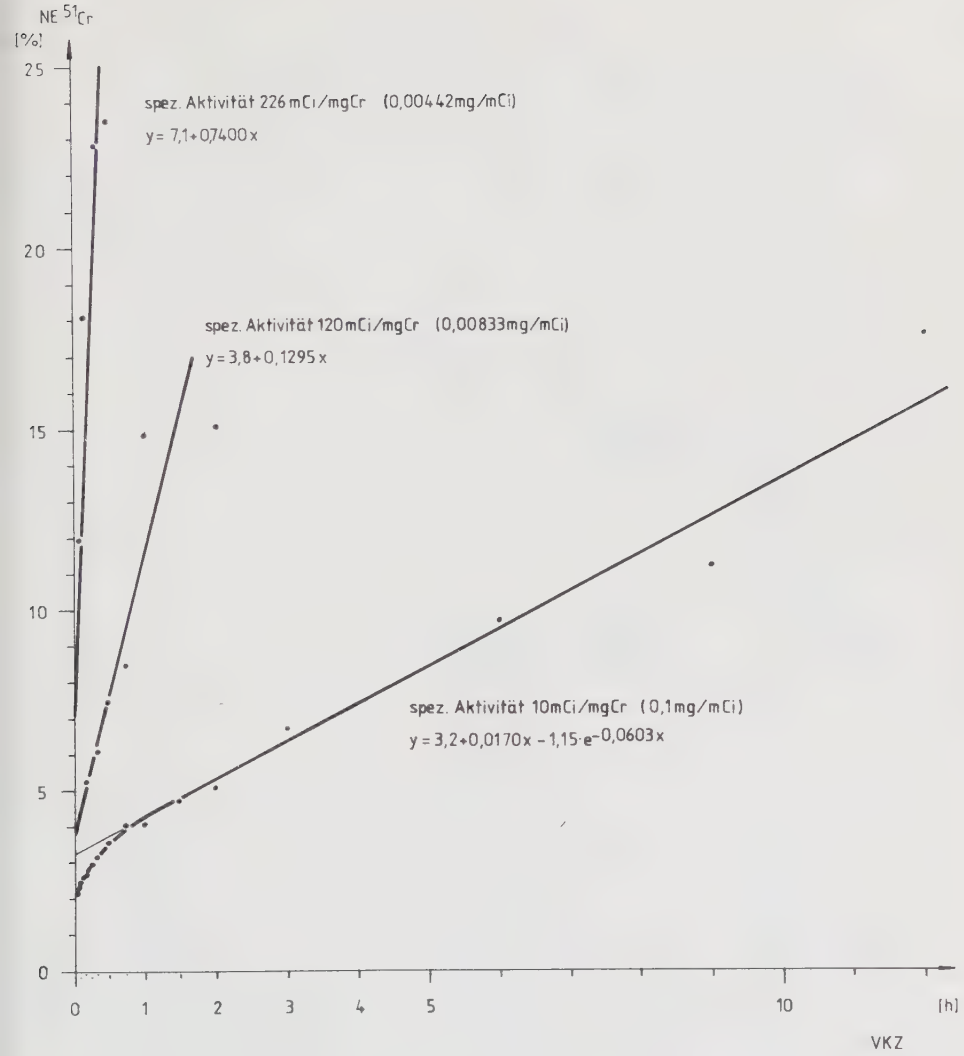


Abb. 9: Abhängigkeit des NE ^{51}Cr von VKZ (IKZ jeweils 20 min) für spezifische Aktivitäten von 120 und 226 mCi/mg Cr (Punkte sind Einzelwerte) sowie für 10 mCi/mg (Punkte jeweils Mittelwerte aus drei Versuchen). Die Parameter der eingezeichneten Kurven wurden graphisch ermittelt.

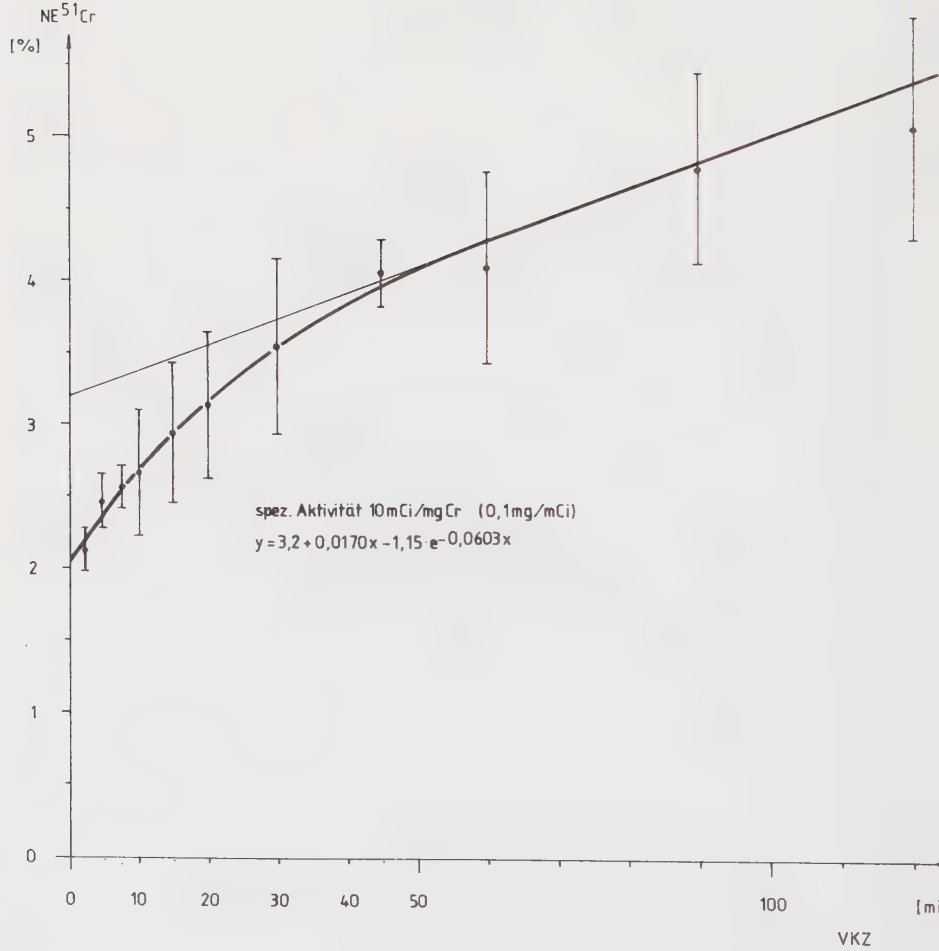


Abb. 10: Detailzeichnung aus Abb. 9

4.1.3 Lagerzeit der ^{51}Cr-Chromatlösung

Die ^{51}Cr-Chromatlösung für das Signette-Verfahren wurde zwischen 0 und 16 Wochen gelagert. Als Markierungsbedingungen werden eine VKZ von 12 min und eine IKZ von 20 min gewählt. Die Ergebnisse für NAT ^{51}Cr und NE ^{51}Cr zeigt Tab. 4. Die Werte zeigen keine signifikante Korrelation gegen die Lagerzeit.

Tabelle 4: NAT ^{51}Cr und NE ^{51}Cr in Abhängigkeit von der Lagerzeit (Stichprobenumfang bei NAT ^{51}Cr jeweils 1):

Lagerzeit	NAT ^{51}Cr	NE ^{51}Cr	Stichprobenumfang	Standardabweichung
Tage	%	%	n	s
keine	61,03	2,71	1	
7		3,11	3	± 0,66
12	60,92	2,92	1	
14		2,17	1	
21		3,05	2	± 0,45
28	59,72	2,94	6	± 0,45
35		2,95	1	
49		3,85	1	
52	64,81	2,64	1	
56		2,64	2	± 0,26
63		3,19	2	± 0,75
84		2,60	2	± 0,16
98		2,81	1	
112		2,23	1	
115	56,07	2,00	1	

4.1.4 ACD-Puffer

Aus technischen Gründen sind Schwankungen der Puffermenge in der Inkubationsspritze unvermeidlich. Wir beobachten in einer Stichprobe von 5 Spritzen Puffergewichte von 17,5 bis 28,0 mg. Um den Einfluß dieser Streuung auf die Markierung zu untersuchen, wird das Puffergewicht über diesen Bereich vermindert. Abb. 11

zeigt den Einfluß dieser Maßnahme auf NE ^{51}Cr. Hervorzuheben ist, daß 1. die reguläre Puffermenge offensichtlich optimal ist und die oben geschilderten technischen Schwankungen praktisch keinen Einfluß auf das NE ^{51}Cr haben. Das bei diesen Versuchen resultierende pH wird mit dem Mikroblutgas-Analysator nach K. Harnoncourt, Gas Check AVL, gemessen (Tabelle 5). Es ist mit den dazugehörigen NE ^{51}Cr-Werten in Abb. 12 wiedergegeben.
Tabelle 6 gibt die pH-Werte bei regulärem Markierungsverlauf wieder.

Tabelle 5: Abhängigkeit des pH-Wertes während der IKZ vom Gewicht des ACD-Puffers (+ = Mittelwerte aus zwei Versuchen).

Puffergewicht mg	pH-Wert
Org.-Gewicht	6,138 +
"	6,268 +
"	6,380 +
22,3	6,138 +
20,0	6,248
17,9	6,207
17,3	6,149
16,6	6,085
13,8	6,560
13,6	6,618
10,8	6,489 +
6,3	6,614 +
3,3	7,100 +

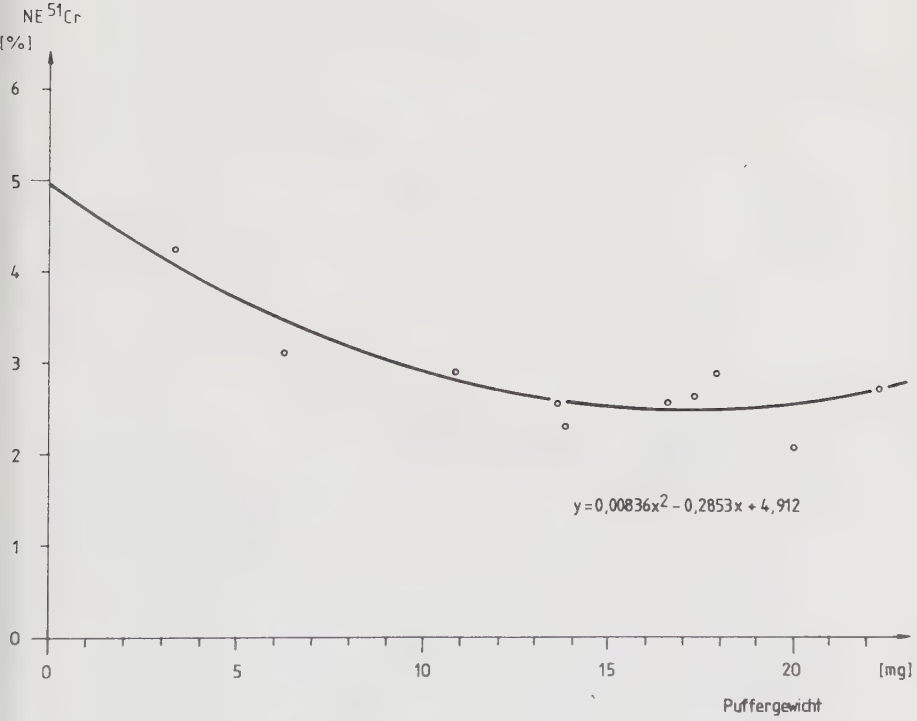


Abb. 11: Abhängigkeit des NE ^{51}Cr vom Gewicht des ACD-Puffers in der Inkubationsspritze. Kurve: berechnetes Polynom 2. Grades. Punkte: Einzelwerte

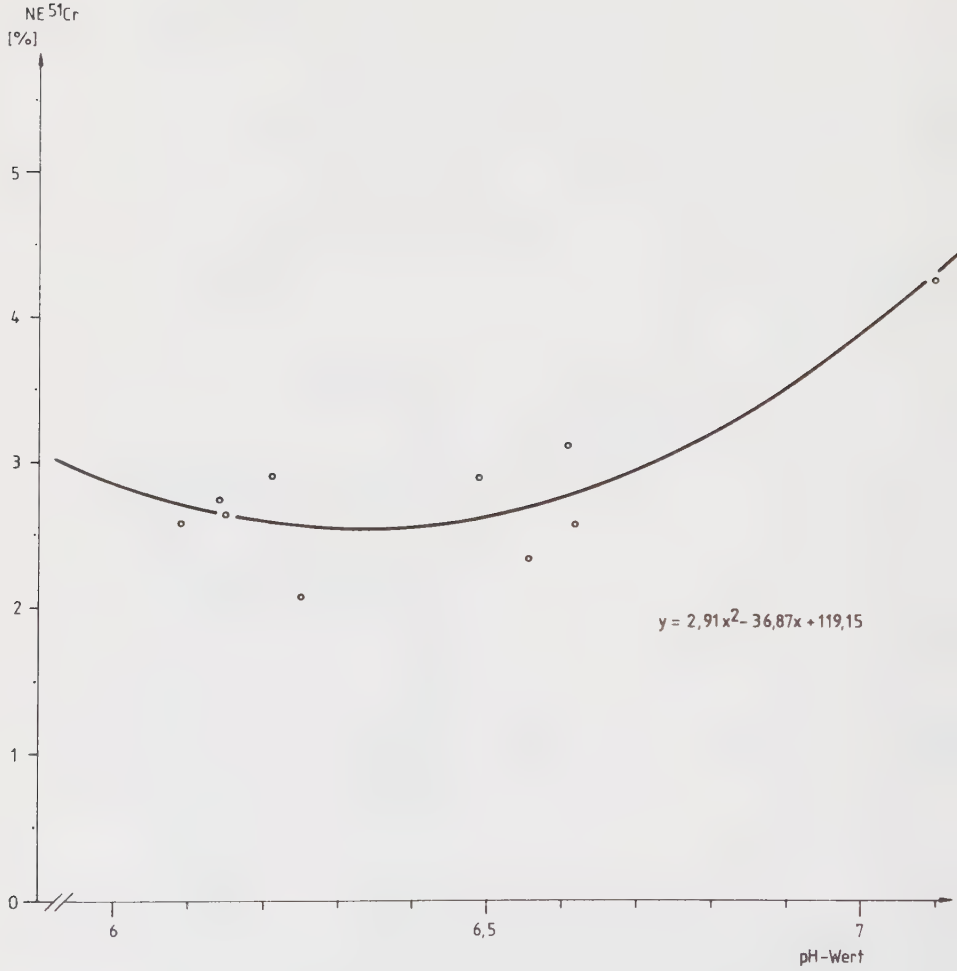


Abb. 12: Zusammenhang zwischen NE ^{51}Cr und dem pH-Wert in der Inkubationsspritze während der IKZ wie er aus Variation der Puffermenge resultiert.
Kurve: berechnetes Polynom 2. Grades.
Punkte: Einzelwerte

Tabelle 6: pH-Werte während der Markierungsabschnitte (Mittelwerte aus jeweils mindestens 3 Versuchen).

1. ^{51}Cr-Chromat und ACD:	pH	4,31
2. ^{51}Cr-Chromat, ACD und Vollblut (VKZ = 30 min, IKZ = 20 min)		
a) zu Beginn der IKZ:	pH	5,76
b) am Ende der IKZ:	pH	5,68
c) nach IAT-Passage:	pH	6,53
3. ^{51}Cr-Chromat, ACD und Serum (VKZ = 30 min, IKZ = 20 min)		
a) zu Beginn der IKZ:	pH	5,31
b) am Ende der IKZ:	pH	5,27
c) nach IAT-Passage:	pH	5,76

Um den Einfluß des Glukosezusatzes in dem ACD-Puffer abzuklären, wird ein Acidum citricum-Dinatriumcitrat-monohydrat-Puffer angesetzt, bei dem gegenüber dem Originalpuffer entsprechend dem Anteil der Glukose an der Isotonocität die Substanzmengen erhöht werden: 19 mg Dinatriumcitratmonohydrat und 6 mg Acidum citricum pro Spritze. Nach Auflösung des Puffers in der Chromat-Lösung resultiert ein pH von 3,92 (Mittelwert aus drei Versuchen). Wie Tabelle 7 zeigt, liegen sowohl das NAT ^{51}Cr in Abhängigkeit von der VKZ auf einem höheren Niveau als auch das NE ^{51}Cr auf einem höheren Niveau.

Tabelle 7: Abhängigkeit des NAT ^{51}Cr und des NE ^{51}Cr von VKZ bei IKZ 20 min bei Verwendung eines Puffers ohne Glukose (Mittelwerte aus jeweils 3 Versuchen).

VKZ min	NAT ^{51}Cr %	NE ^{51}Cr %
10	82	5,81
20	83	3,64
60	57	9,65
120	47	6,88
180	21	22,99
360	21	15,69

4.1.5 Zusatz von Ascorbinsäure oder Aminosäuren

Der Einfluß von L-Ascorbinsäure und Aminosäuren wird in Selbstversuchen geprüft. Die Markierungsbedingungen werden mit VKZ 20 min und IKZ 20 min jeweils konstant gehalten. Eine besondere Prämedikation erfolgt nicht. Die Untersuchungen erfolgen mit einer Ausnahme in mehrwöchigen Abständen, lediglich der Versuch mit 1,0 g Ascorbinsäure i.v. wird 6 Tage nach Applikation von 2,5 g i.v. durchgeführt. Für die orale Applikation werden frisch aus dem Handel bezogene Tabletten Cebion® 1g (Brausetabletten) der Firma Merck verwendet, für die i.v.-Applikation Cebion® Ampullen 1g (fortiss.) der Firma Merck. Die Aminosäuren werden in zwei verschiedenen Mischungen oral appliziert: 1. als Aminosäurengemisch von 5 g L-Serin, 10 g DL-Tryptophan und 10 g DL-Threonin und 2. als Aminofusin L-forte® der Firma Pfrimmer.

Die Ergebnisse für NAT ^{51}Cr und NE ^{51}Cr in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis und Zeit nach der Applikation zeigen Abb. 13 bis 15. Die NE ^{51}Cr-Werte nach Aminosäuren-Gabe werden mit Hilfe der Faktoren-Analyse geprüft. Lediglich die Werte nach Aminofusion weichen

mit p = 0,0334 in der Varianzanalyse signifikant voneinander ab. Nach der Aminosäuren-Mischung aus den drei Aminosäuren L-Serin, DL-Tryptophan und DL-Threonin nimmt das NE ^{51}Cr mit einem p = 0,153 nicht signifikant zu.

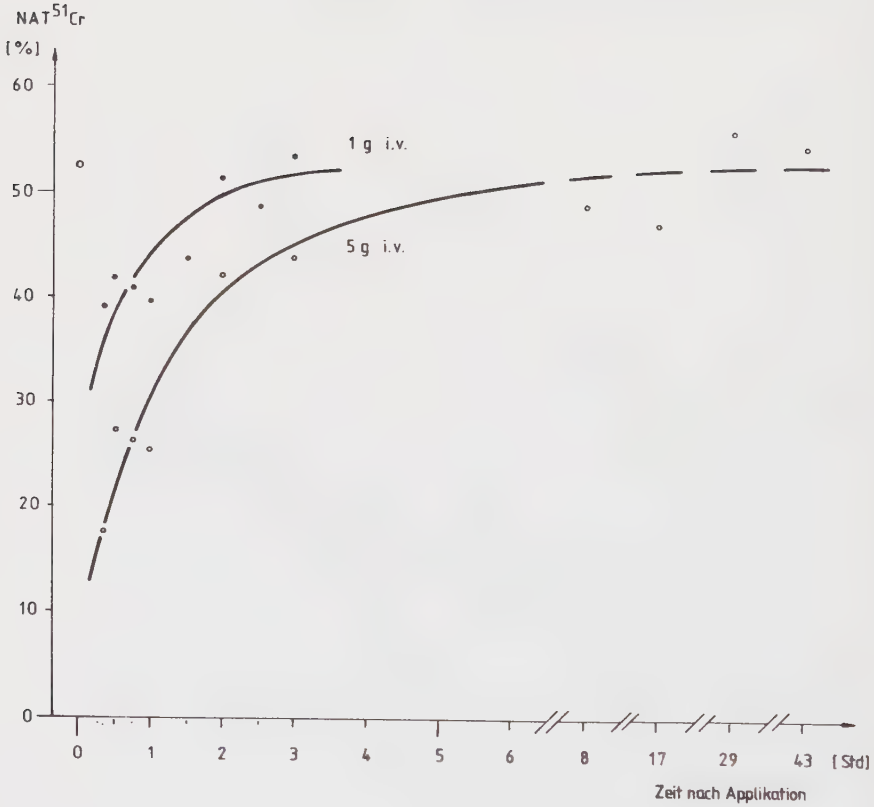


Abb. 13: Abhängigkeit des NAT ^{51}Cr von der Dosis und der Zeitlatenz einer L-Ascorbinsäure-Medikation. Punkte: Mittelwerte aus jeweils drei Meßansätzen. Kurven: graphisch interpoliert.

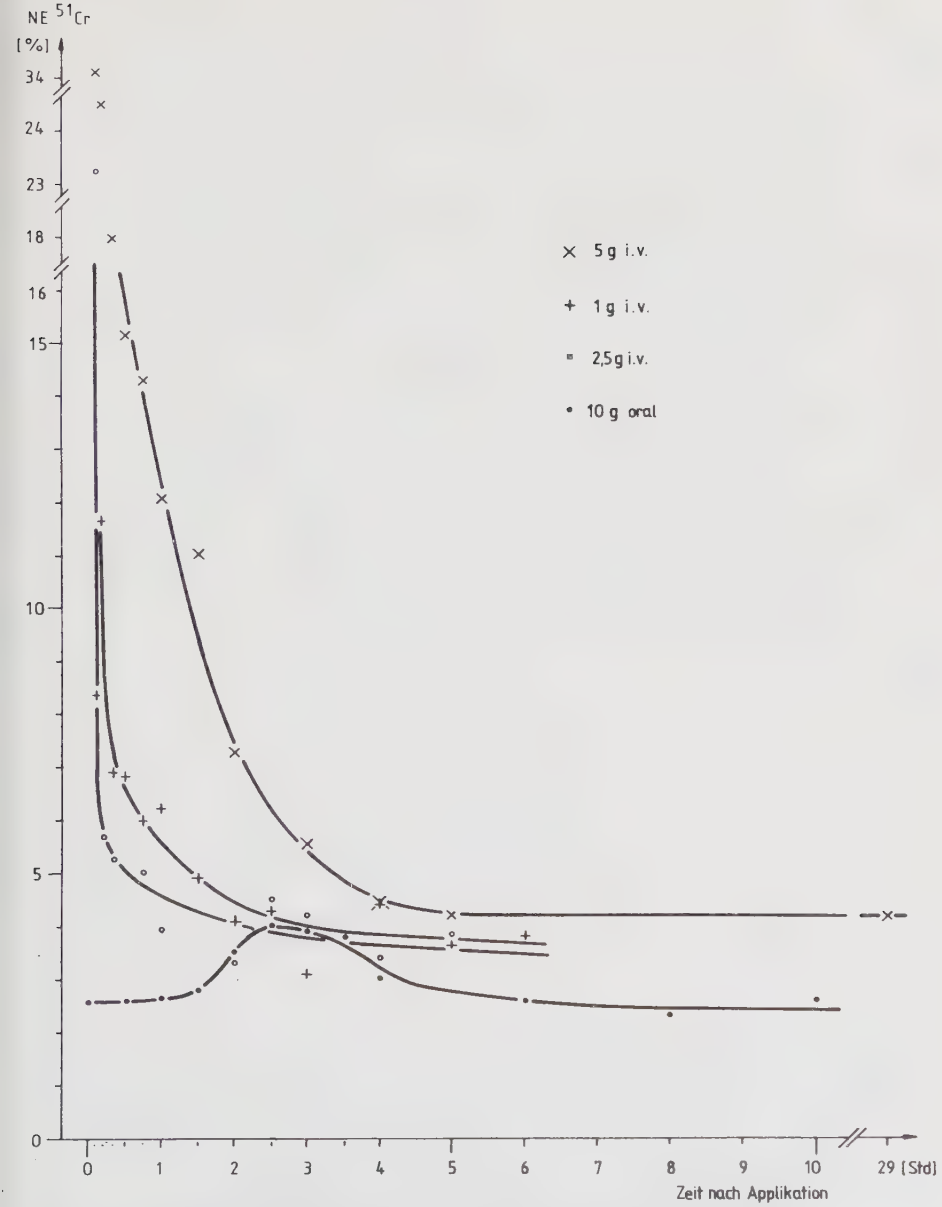
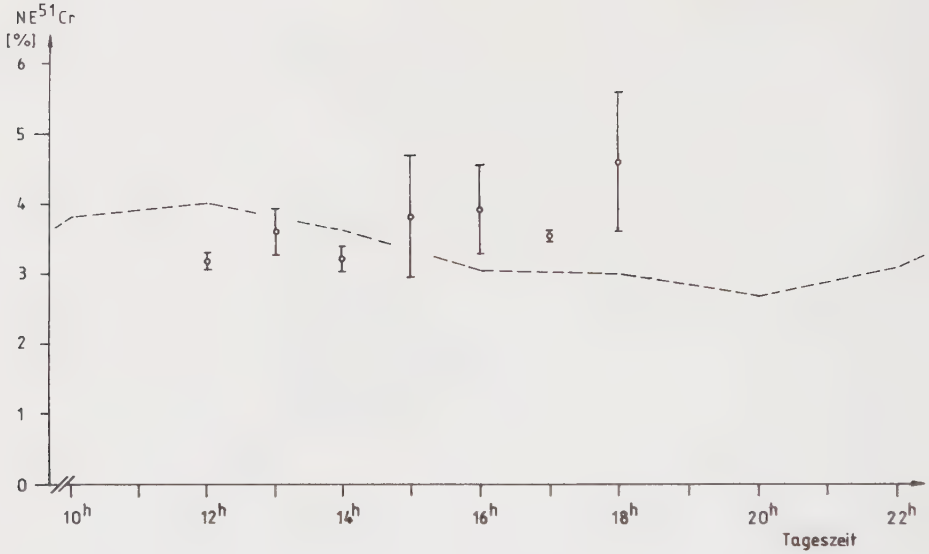


Abb. 14: Abhängigkeit des NE ^{51}Cr von der Dosis und der Zeitlatenz einer L-Ascorbinsäure-Medikation.
Punkte: Mittelwerte aus jeweils drei Meßansätzen.
Kurven: graphisch interpoliert.



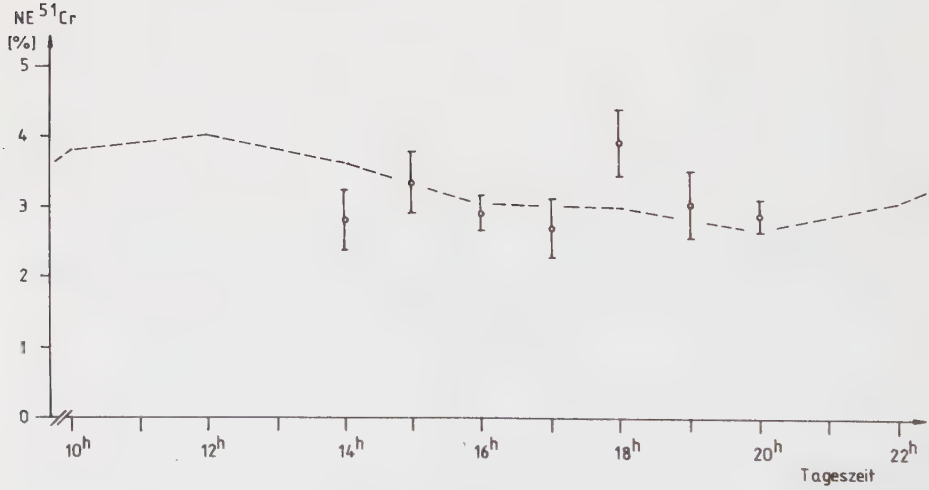


Abb. 15: Verlauf des NE ^{51}Cr nach oraler Applikation von Aminosäuren-Gemischen. Oben: drei Aminosäuren mit Applikation um 12 Uhr. Unten: Aminofusion® 500 ml um 14 Uhr. Mittelwert und einfache Standardabweichung aus jeweils drei Meßansätzen. Gestrichelt: Tageszeitverlauf des NE ^{51}Cr aus Abb. 16

4.1.6 Tageszeit der Blutentnahme

Der Einfluß der Tageszeit auf das NE ^{51}Cr wird unter Einhaltung konstanter Markierungsbedingungen (VKZ 10 min, IKZ 20 min) an drei verschiedenen Tagen im Selbstversuch untersucht. Mahlzeiten werden ab 9 Uhr in zweistündigen Abständen bis 23 Uhr eingenommen. Das Ergebnis ist in Abb. 16 wiedergegeben. Sowohl die Einzelkurven als auch der Gesamtverlauf werden einer Varianzanalyse unterworfen. Der Gesamtverlauf wird so ermittelt, daß die Einzelwerte jeweils auf den dazugehörigen Wert für Tageszeit O Uhr bezogen werden. Bis auf eine Ausnahme ergeben sich eine Signifikanz des tageszeitabhängigen Verlaufes (siehe Tab. 8).

Tabelle 8: Ergebnis der Faktorenanalyse für die Abhängigkeit des NE ^{51}Cr von der Tageszeit. Numerierung der Versuchstage entsprechend Abb. 16

Kurven	p
1	0,179
2	0,023
3	< 0,001
Gesamtkurve	< 0,001

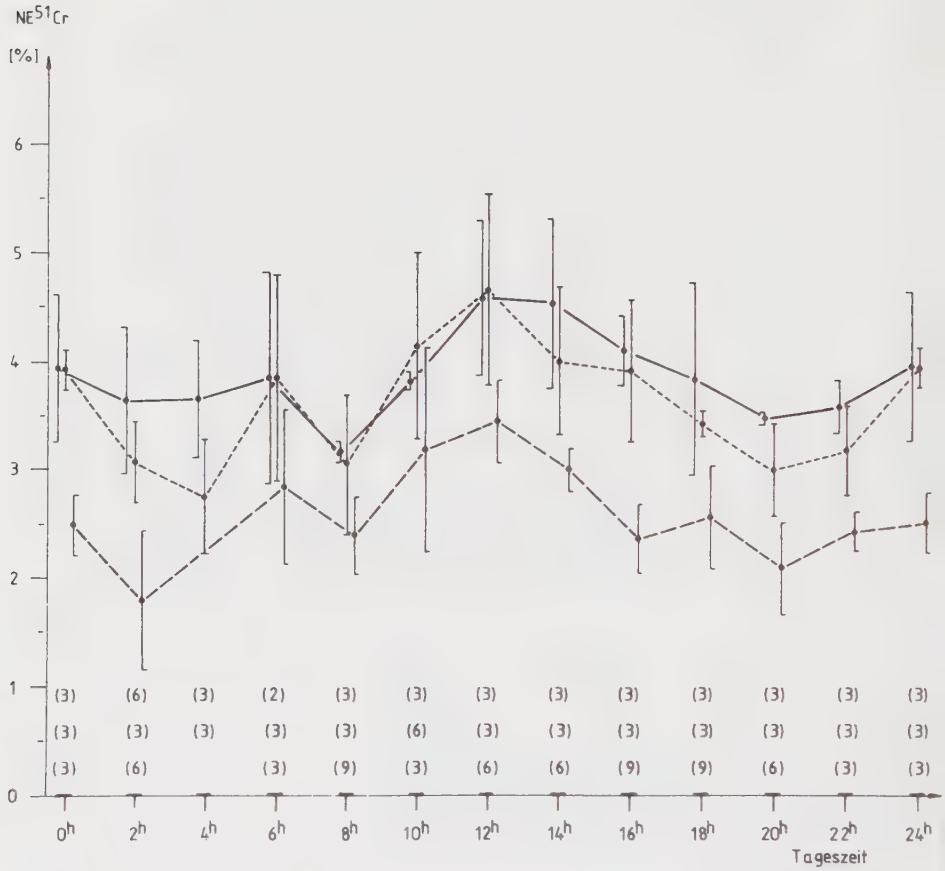


Abb. 16: Abhängigkeit des NE ^{51}Cr von der Tageszeit der Blutentnahme an drei verschiedenen Tagen (VKZ 10 min, IKZ 20 min).
Durch Polygonzug verbundene Mittelwerte mit einfacher Streuung. Kurvennummern von oben nach unten 1 bis 3. Eingeklammerte Zahlen entsprechend Zahl der jeweiligen Meßansätze.

4.1.7 Lagerung bis zur Reinjektion

Aus zwei verschiedenen Blutentnahmen werden je 4 Markierungen durchgeführt und die Spritze nach IAT-Passage jeweils bei Zimmertemperatur (25°C) gelagert. Vor und nach der Lagerung wird jeweils das NE ^{51}Cr gemessen. Tab. 9 zeigt, daß das NE ^{51}Cr (VKZ und IKZ jeweils 20 min) im Mittel um 2 % des Ausgangswertes abnimmt. Auch bei paarweisem Vergleich kann die Signifikanz nicht bewiesen werden. Das relativ hohe Niveau des NE ^{51}Cr ist auf die 2 bis 3 Stunden vor Blutentnahme applizierte Dosis von 5 g Ascorbinsäure i.v. zurückzuführen.

Tabelle 9: Einfluß der Lagerzeit nach IAT-Passage bis zur Reinjektion auf das NE ^{51}Cr (VKZ 20 min, IKZ 20 min). Blutentnahme 2 bis 3 Stunden nach 5 g i.v. Ascorbinsäure.

Ausgangswert	nach 12 Std. Lagerzeit	relative Änderung
6,57	6,55	- 0,003
6,68	6,69	0,001
6,65	6,27	- 0,057
6,80	6,99	0,028
5,41	5,87	0,085
6,04	5,94	- 0,017
5,94	5,53	- 0,069
5,64	4,92	- 0,128
	Mittelwert	- 0,0199
	Standardabweich.	± 0,065

4.2 Komponentenanalyse des NE ^{51}Cr

4.2.1 Physikalisch-chemische Komponententrennung

4.2.1.1 Elektrophorese

Die Elektrophoresen werden bei 140 V und 10 min Laufzeit durchgeführt. Als Träger dienen Acetat-Gel-Streifen, als Elektrophoresebad Michaelis-Puffer (Veronal-Veronalnatrium, pH 8,6; 0,036 m) im Verhältnis 1:1 mit aqua dest. verdünnt. Die zu untersuchenden Substanzen werden in der Mitte des 16 cm langen Gel-Streifens aufgetragen. Nach 10 bzw. 30 min Laufzeit wird der Streifen entweder in Stücke von 1 cm Länge oder entsprechend einem mit Amidoschwarz-10 B gefärbten Muster mit Berücksichtigung der Proteinbanden zerschnitten und deren Aktivität im Probenwechsler Gamma-Scint 8F 3200 bei 10 min Meßzeit gemessen. Es werden jeweils 3 Parallelansätze durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 10 bis 12 wiedergegeben.
Hervorzuheben ist, daß nach der Inkubation neben ^{51}Cr-Chromat mehrere Komponenten mit unterschiedlicher Beweglichkeit vorliegen, davon mehrere mit Bewegung zur Anode.

Tabelle 10: Aktivitätsverteilung (Impulse pro 10 min, Mittelwerte aus jeweils 3 Versuchen) im Acetat-Gel-Streifen nach Elektrophorese mit 10 min Laufzeit bei 140 V ((A) = Auftragsstelle).

1. ^{51}Cr-Chromat
2. ^{51}Cr-Chromat und ACD (VKZ = 30 min) nach Passage durch den IAT
3. Spülflüssigkeit aus Versuchsansatz 2
4. Seruminkubation (VKZ = 30 min, IKZ = 20 min, vor Passage durch den IAT)
5. Vollblutinkubation (Überstand nach Zentrifugation, VKZ = 30 min, IKZ = 20 min, vor Passage durch den IAT)

			1.	2.	3.	4.	5.
Aufgetragen			1011614	485	8904	117825	80153
Pol		cm-Stück Nr.					
-		1-7	0	0	0	0	0
	(A)	8	9336	524	4467	2822	1025
		9	282150	0	7057	23941	5957
		10	965202	150	0	29775	75447
		11	4905	0	0	98494	10738
		12	0	0	436	440	0
		13	0	0	0	316	0
		14	0	0	0	0	269
		15	0	0	617	0	0
+		16	0	0	0	0	0

Tabelle 11: Aktivitätsverteilung, wie Tab. 10, jedoch mit 30 min Laufzeit

1. ^{51}Cr-Chromat
2. ^{51}Cr-Chromat und ACD (VKZ = 30 min), keine IAT-Passage
3. Seruminkubation (VKZ = 30 min, IKZ = 20 min, nach IAT-Passage).
4. Vollblutinkubation (Überstand nach Zentrifugation, VKZ = 30 min, IKZ = 2,5 min, nach IAT-Passage)

			1.	2.	3.	4.
Aufgetragen:			979017	979029	22699	5862
Pol	Stück Nr.	Abschn.-länge				
-	1-5	10 mm	0	0	0	0
Glob.	6	8	465	1251	0	0
(A)	7	6	119190	92847	5586	172
Albu.	8	8	1586	96010	939	517
	9	10	1799	36268	2695	363
	10	10	1226	456658	1360	3043
	11	10	1189	708031	14017	2999
+	12	10	1561	1509	0	0

Tabelle 12: Aktivitätsverteilung, wie Tab. 10, jedoch mit 30 min Laufzeit und Abhängigkeit von der IKZ. Vollblutinkubation (Überstand nach Zentrifugation, VKZ = 30 min, nach IAT-Passage).

IKZ (min)		5	10	20	45	60
Aufgetragen:		7416	7000	10650	5700	4219
Pol	Stück Nr.					
-	1-6	0	0	0	0	0
(A)	7	566	544	791	722	868
	8	462	525	1256	786	645
	9	474	457	1146	632	687
	10	5714	7399	5605	3038	1744
	11	2265	162	4136	1658	603
+	12	0	0	714	119	226

4.2.1.2 Ultrafiltration durch Vakuum-Dialyse

Untersucht wird der Überstand nach Zentrifugation markierten Vollblutes (VKZ 30 min, IKZ variiert zwischen 5 und 120 min). Proben von jeweils 2 ml werden über 2mal 24 Std. kältedialysiert und die Aktivität des Rückstandes gemessen. Das Ergebnis zeigt Abb. 17. Nach ihr nimmt der Anteil nicht dialysierbarer Aktivität mit wachsender IKZ zu, während die Dialysegeschwindigkeit abnimmt.

4.2.1.3 Äthanolische Fällung

1 ml des Überstandes aus den Versuchsansätzen zur Vakuumdialyse (s. 4.2.1.2) wird mit 0,1 ml gesättigter inaktiver Chromatlösung (17 mg Natriumchromat in 10 ml aqua dest.) und 1 ml absolutem Äthanol versetzt. Der Bodensatz wird vor der Aktivitätsmessung zweimal mit je 0,5 ml 50%igem Äthanol gewaschen. Tab. 13 zeigt, daß nur ein relativ kleiner Anteil in entsprechend starker Proteinbindung vorliegt, der aber mit der IKZ zunimmt.

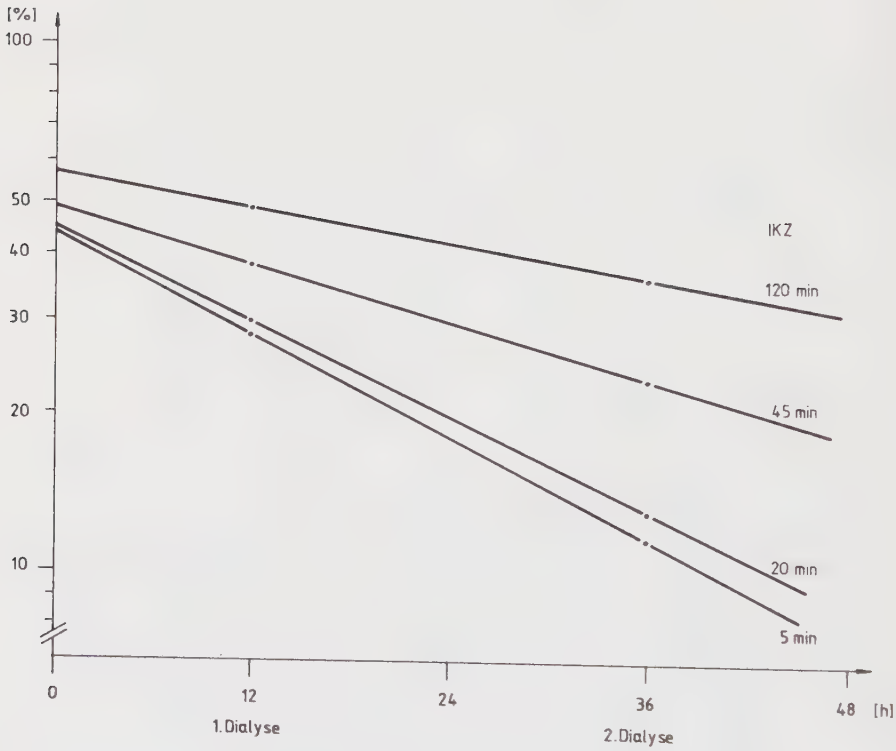


Abb. 17: Aktivitätsrückstand nach Vakuumdialyse in Abhängigkeit von der IKZ. Relativwerte in Prozent der Ausgangsaktivität (Mittelwerte aus jeweils 2 Versuchen, im halblogarithmischen Netz wurden die Ergebnisse für jeweils gleiche IKZ durch Gerade verbunden).

Tabelle 13: Aktivitätsrückstand nach äthanolischer Fällung in Abhängigkeit von IKZ. Relativwerte in Prozent der Ausgangsaktivität (Mittelwerte aus jeweils zwei Versuchen).

IKZ (min)	Aktivitätsrückstand (%)
5	2,38
20	3,26
45	3,50
120	4,50

4.2.1.4 Anionenaustauscher-Chromatographie

Verwendet werden die zum Signette-Verfahren hergestellten Anionenaustauscher-Schläuche. Nach dem üblichen Markierungsablauf mit VKZ 30 min und IKZ 20 min werden die Schläuche mit 5 ml aqua bidest. gespült und zur Bestimmung des Aktivitätsgehaltes in Stücke von 1 cm Länge zerschnitten. Zur Verdopplung der Säulenlänge wird dasselbe Material durch einen zweiten IAT-Schlauch gedrückt, nachdem die neue Spritzenschlauchkombination so rasch wie möglich auf einen zweiten Signetteapparat umgelegt wurde (ca. 0,5 min Zeitspanne; der 3 min Rücklauf der Apparatur muß also nicht abgewartet werden). Abb. 18 zeigt drei Komponenten mit unterschiedlichem Austauschverhalten. Der Anteil der ersten Komponente scheint während der Zeitspanne, die für den Wechsel des IAT-Schlauches benötigt wurde, wieder zuzunehmen. Nach Abb. 19 scheint das NE ^{51}Cr unter üblichen Markierungsbedingungen am stärksten mit dem Anteil der dritten Komponente zu korrelieren.

Bei zwei Kontrollversuchen, in denen ^{51}Cr-Chromat-Lösung auf gleiche Weise nacheinander zwei Schläuche passierte, finden wir eine unmittelbare Fortsetzung des Aktivitätsverlaufes über beide Schläuche. Damit ist ausgeschlossen, daß die höhere Aktivitätskonzentration, die unter den normalen Markierungsbedingungen

im Beginn des zweiten Schlauches gegenüber dem Ende des ersten Schlauches gefunden wird (Abb. 18), ein Artefakt durch Kompression des IAT-Granulates ist.

Gesondert geprüft wird der Einfluß von Ascorbinsäure-Zusatz in vivo vor Blutentnahmen, indem 5, 20 und 45 min nach i.v.-Injektion von 2,5 g L-Ascorbinsäure das Blut zur Markierung abgenommen wird. Die in Abb. 20 wiedergegebenen Aktivitätsverläufe werden so untersucht, daß die in Abb. 18 ermittelten Exponentialkoeffizienten bis zur bestmöglichen Deckung auf die jeweiligen Werte übertragen werden.

Tabelle 14 zeigt, daß der Anteil der langsamen Komponente absolut und relativ umso größer ist je geringer die Zeitspanne nach der Ascorbinsäure-Injektion ist. Dagegen scheint die rasche Komponente absolut nicht systematisch sich zu verändern, höchstens 5 min nach Injektion etwas niedriger zu liegen. Zusätzlich weichen bei der Kurve 5 min und 20 min nach Ascorbinsäure-Injektion die Aktivitätswerte der ersten beiden bzw. des ersten Schlauchabschnittes so stark von der ersten raschen Komponente ab, wie es der Existenz einer zusätzlichen noch rascheren Komponente entsprechen könnte.

Tabelle 14: Charakteristika der Komponenten bei graphischer Zerlegung des Aktivitätsverlaufes im IAT-Schlauch von Abb. 20 in Exponentialfunktionen. Der Pfeil verweist auf den übernommenen Zahlenwert (s. Text).

	mit Vorinjektion vor			ohne Vorinjektion
	5min	20min	45min	
1.Komponente y-Achs.abschn. (I/min)	$3,95072 \times 10^5$	$3,65735 \times 10^5$	$3,07061 \times 10^5$	$2,28829 \times 10^5$
Austauschrate (1/cm)	→	→	→	0,2236
Halbwertsstrecke (cm)	→	→	→	0,1000
2.Komponente y-Achs.abschn. (I/min)	$3,30207 \times 10^6$	$3,92678 \times 10^6$	$8,29979 \times 10^6$	$5,66706 \times 10^6$
Austauschrate (1/cm)	→	→	→	0,7296
Halbwertsstrecke (cm)	→	→	→	0,9500
3.Zusatzkompon. y-Achs.abschn. (I/min)	$2,54717 \times 10^7$	$2,39997 \times 10^7$		
Austauschrate (1/cm)	1,38629	←		
Halbwertsstrecke	0,5000	←		

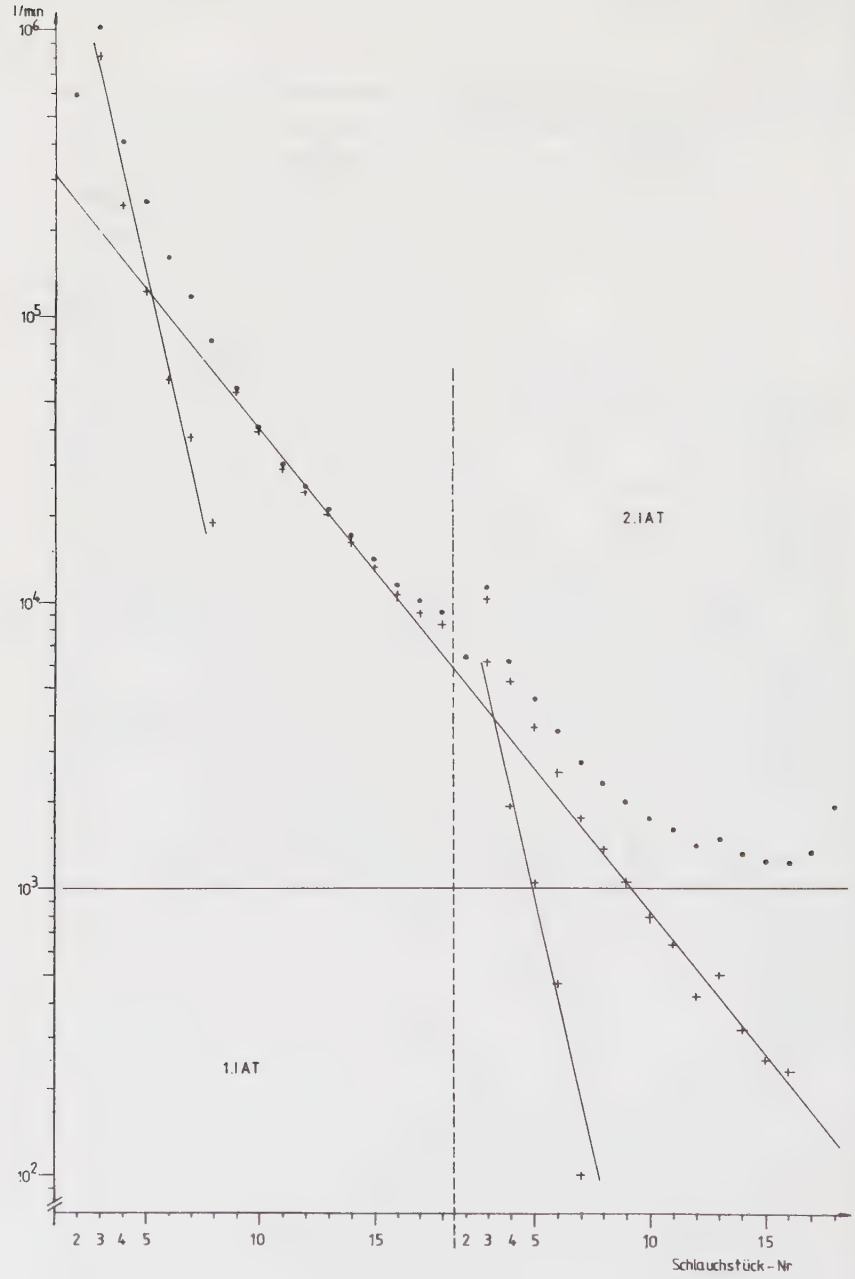


Abb. 18: Aktivitätsverlauf im IAT-Schlauch.
Abszisse: Abstand vom Schlauchbeginn in cm
Ordinate: Aktivität pro cm IAT-Schlauch
(VKZ 60 min und IKZ 20 min)
Punkte: Mittelwerte aus drei Versuchen
Kreuze und Geraden im halblogarithmischen Netz:
graphische Analyse der Komponenten.

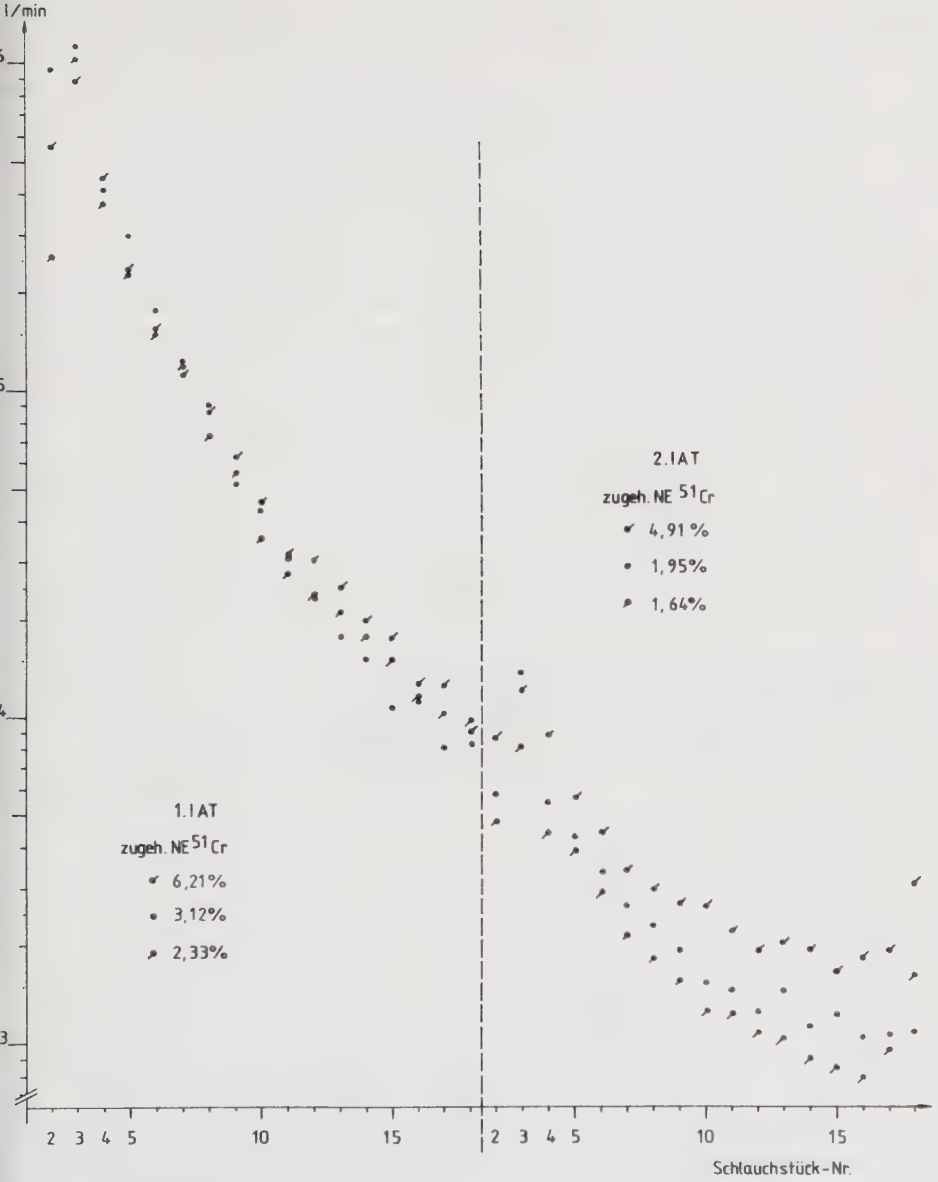


Abb. 19: Wie Abb. 18, jedoch Einzelwerte mit Zuordnung der Symbole zum gemessenen NE ^{51}Cr.

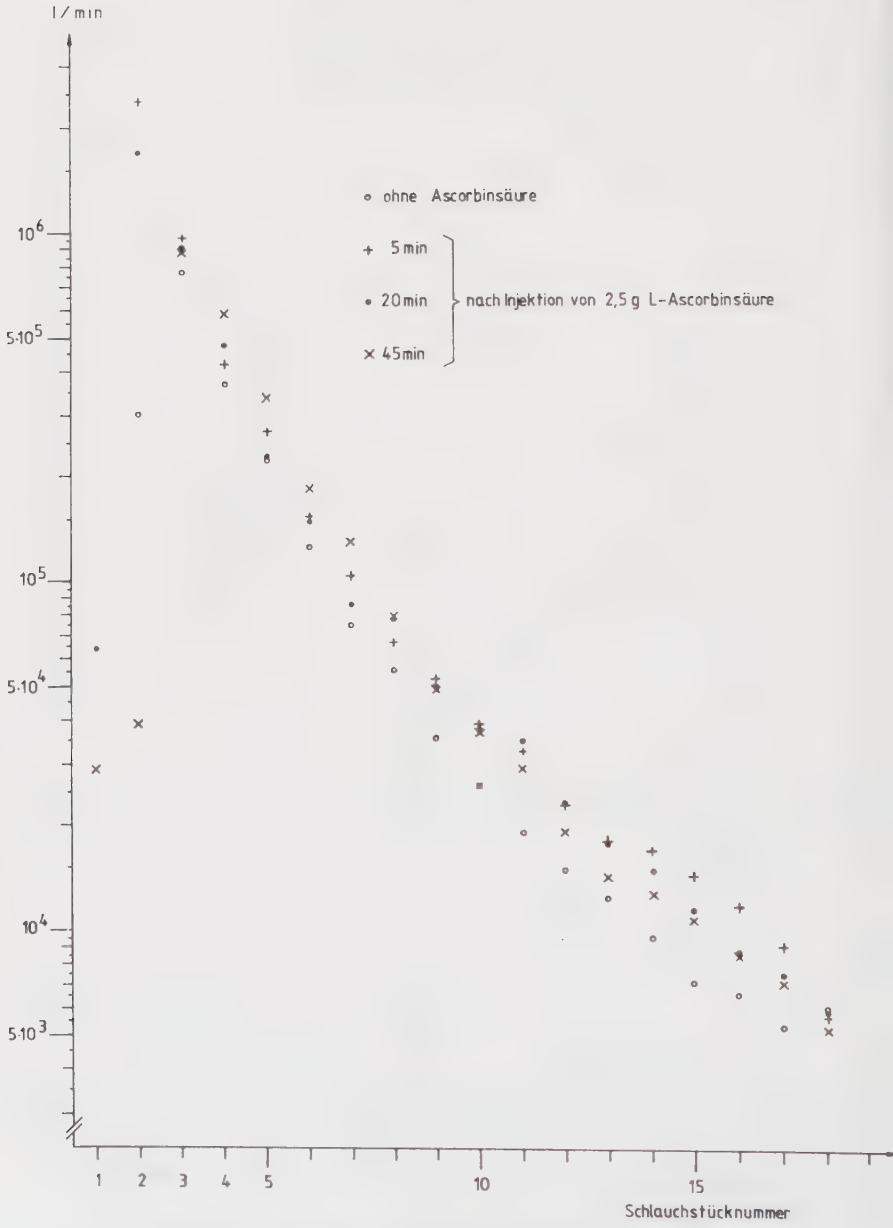


Abb. 20: Aktivitätsverlauf im IAT-Schlauch
Abszisse und Ordinate wie Abb. 18 (VKZ 20 min und IKZ 20 min). Zusätzlich Aktivitätsverläufe nach Injektion von 2,5 g L-Ascorbinsäure (Einzelwerte).

Reines Chromat (nach dreiwöchiger Lagerung) zeigt im IAT-Schlauch eine dominierende Komponente mit einer Austauschrate von 0,942 - 1,155/cm. Daneben erscheint eine nicht weiter abklärbare Komponente von 10 %, die eine Austauschrate von 0,272/cm aufweist. Nach einer VKZ von 30 min mit ACD-Puffer findet sich eine Komponente mit einer Austauschrate von 0,866/cm verbunden mit einer kaum nachweisbaren (unter 1 % Anteil) 2. Komponente mit einer Austauschrate von 0,127/cm. Unter den besonderen Markierungsbedingungen unter Ascorbinsäurezusatz und Seruminkubation, mit denen das in-vivo-Verhalten nach siehe 4.2.3 untersucht wurde, finden wir nur eine einzige relativ flache Komponente mit einer Austauschrate von 0,09/cm.

Die Dialysate aus den ersten 24 Stunden, die in den Versuchen zu 4.2.1.2 anfielen, zeigen übereinstimmend zwei Komponenten mit einer Austauschrate von 0,381/cm bzw. 0,073/cm (s. Abb. 21).

Bemerkenswert erscheint, daß mit zunehmender IKZ zwar die langsame und die raschere Komponente deutlich abnehmen, die rascheren Komponenten aber absolut unverändert bleiben.

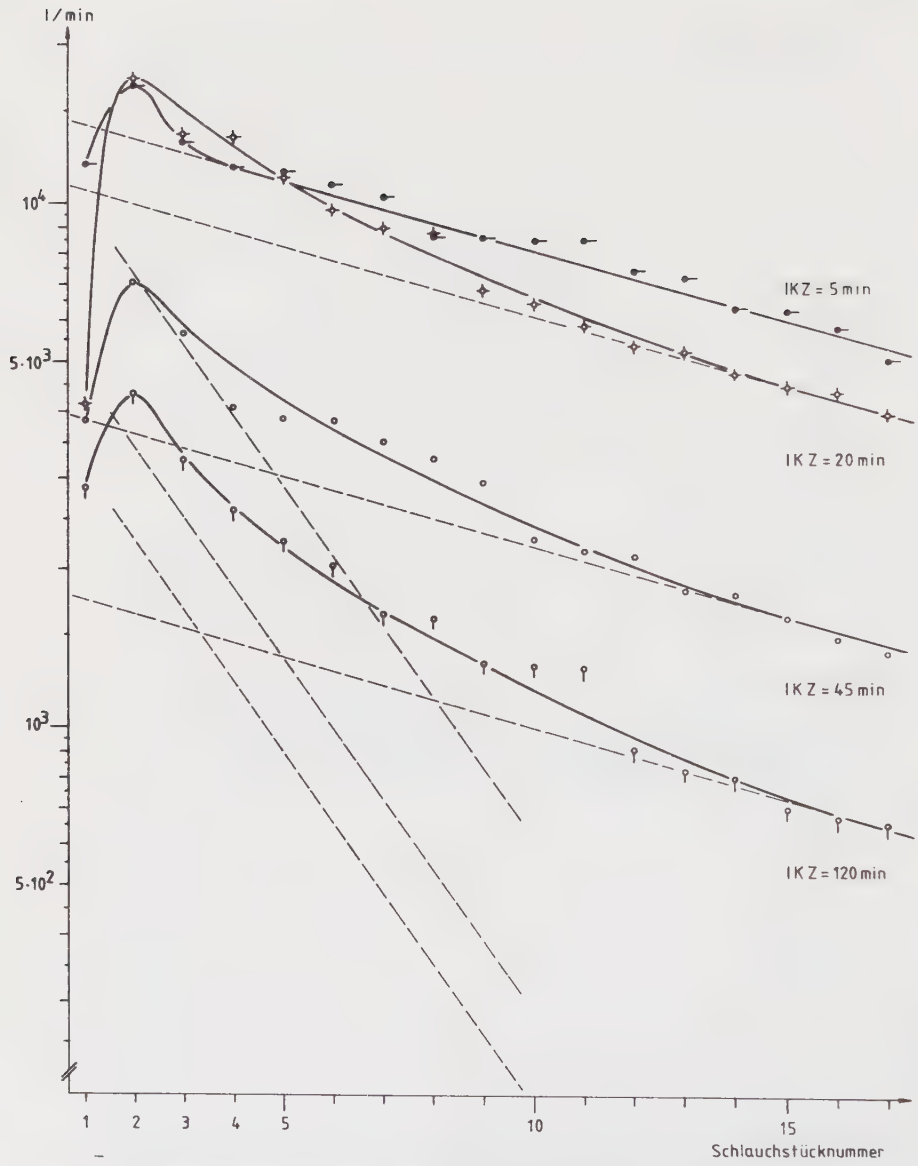


Abb. 21: Aktivitätsverlauf im IAT-Schlauch bei Passage der Dialysat-Flüssigkeit aus Versuch 4.2.1.2 (1.Dialyse)
Abszisse und Ordinate wie Abb. 18.
Punkte: Mittelwerte aus 3-fachen Aktivitäts-Messungen je eines Versuchsansatzes zu jeder IKZ.
durchgezogen: graphisch interpolierter Aktivitätsverlauf
gestrichelt: graphische Analyse der Exponentialfunktionen mit 2 Komponenten (für die oberste Kurve (IKZ = 5 min) kann nur eine Komponente konstruiert werden).

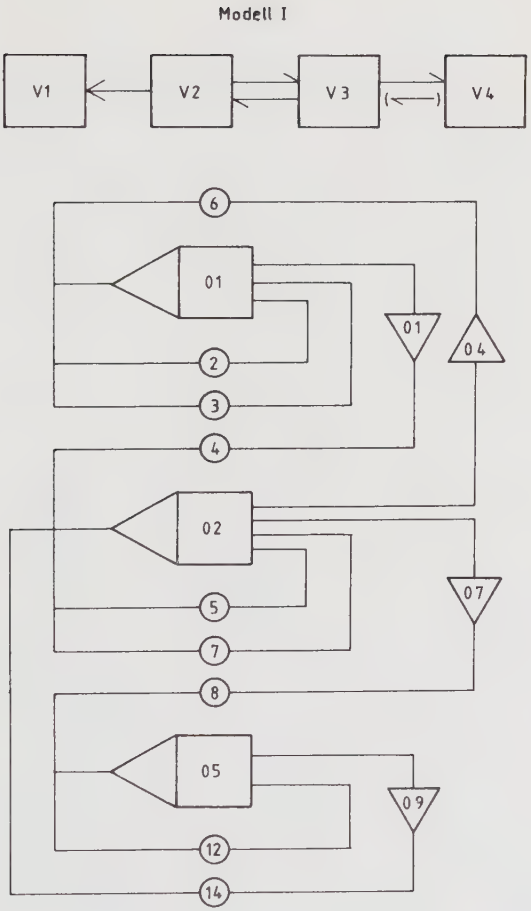


Abb. 22: Schaltung des Analog-Rechners für ein Ketten-Modell (Modell I)
Zuordnung der Integratoren und Potentiometer wie in Abb. 24

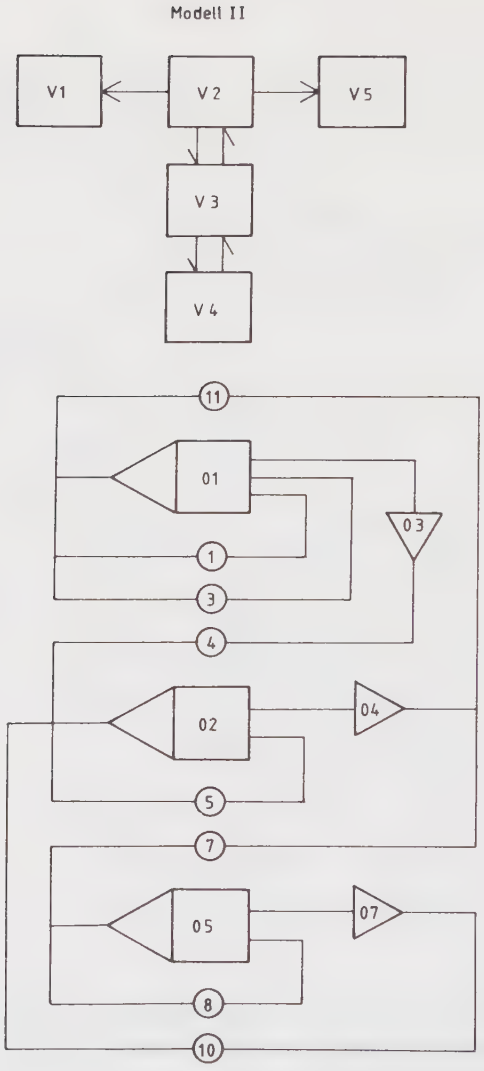
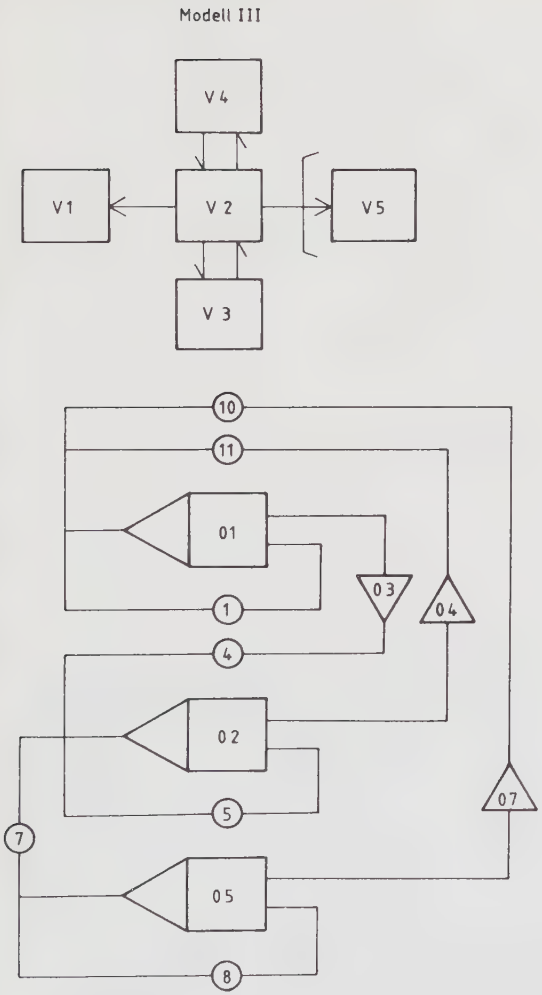


Abb. 23: Wie Abb. 22, jedoch mit zusätzlicher Verzweigung (Modell II).



Integratoren

V2 : 01

V3 : 02

V4 : 05

Potentiometer

1 : 6,43 $\left[\frac{\varrho_{21}+\varrho_{25}+\varrho_{23}+\varrho_{24}}{V2}\cdot T\right]$

4 : 6,46 $\left[\frac{\varrho_{23}}{V3}\cdot T\right]$

5 : 98,3 $\left[\frac{\varrho_{32}}{V3}\cdot T\right]$

7 : 1,105 $\left[\frac{\varrho_{24}}{V4}\cdot T\right]$

8 : 0,395 $\left[\frac{\varrho_{42}}{V4}\cdot T\right]$

10 : 0,395 $\left[\frac{\varrho_{42}}{V2}\cdot T\right]$

11 : 9,2 $\left[\frac{\varrho_{32}}{V2}\cdot T\right]$

Abb. 24: Wie Abb. 22, jedoch ausschließlich verzweigtes Modell (Modell III).

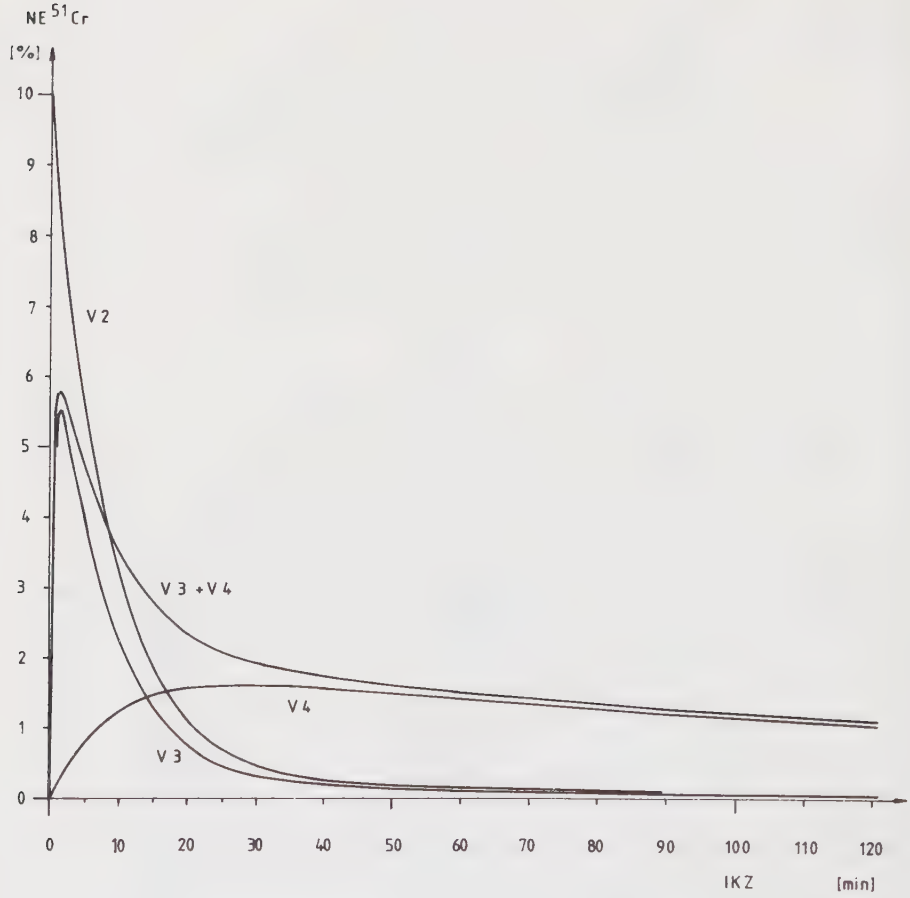


Abb. 25: Spannungsverläufe im Modell III mit den in Abb. 24 angegebenen Einstellwerten.
Die beste Übereinstimmung mit der experimentellen Abhängigkeit des NE ^{51}Cr von der IKZ (bei VKZ 20 min) ergibt sich, wenn der Spannungsverlauf von V_3 und V_4 vollständig und ein Anteil des Spannungsverlaufes von V_2 addiert werden.

4.2.2 Analogrechner-Analyse

Am Telefunken-Analogrechner RAT 700/2 werden drei in Abb. 21 bis 23 demonstrierte Modelle gesteckt. In dieser Modellannahme entspricht V_1 dem E ^{51}Cr, V_2 dem Chromat bzw. dem nicht proteingebundenen reduzierten Chrom (diese beiden Komponenten fassen wir wegen der hohen Geschwindigkeit des Redoxsystems in einem Compartment zusammen), V_3 entspricht dem locker gebundenen Chrom, V_4 dem fester gebundenen Chrom. Als Anfangswerte in der Kurvenangleichung entnehmen wir Schätzwerte aus unseren experimentellen Kurven und zwar die Geschwindigkeit, mit der der NAT ^{51}Cr-Wert zunimmt (diese werden dann entsprechend in die erythrocytäre und nichterythrocytäre Komponente unterteilt) sowie Mengenanteil und Geschwindigkeitsänderung der in den Dialyse- und Fällungs-Versuchen gefundenen proteingebundenen Aktivität. Die Spannungen in den Compartments V_2, V_3 und V_4 werden in ihrem Verlauf mit der experimentellen Kurve der Abhängigkeit des NE ^{51}Cr von der IKZ verglichen. Durch keine Parametervariation ist eine Übereinstimmung zu erreichen. Daraufhin führen wir ein weiteres Compartment ein, das direkt aus dem V_2-Compartment unindirektional gespeist wird und geben ihm die Parameter der fest proteingebundenen Aktivität. V_4 erhält die Parameter für die locker proteingebundene Aktivität und V_3 wird in weiten Grenzen variiert. Auch hierbei läßt sich keine befriedigende Kurvenübereinstimmung erzielen. Schließlich wird das Modell so variiert, daß alle Compartments V_1, V_3, V_4 und V_5 direkt an das Compartment V_2 angekoppelt werden. Die bestmögliche Kurvenangleichung erzielen wir mit den in Abb. 24 präsentierten Parameterwerten, die damit errechnete Kurve ist in Abb. 25 der experimentellen gegenübergestellt.

4.2.3 In vivo-Verhalten

Serum von 4 Freiwilligen wird mit ^{51}Cr unter Ascorbinsäurezusatz wie folgt markiert: die 0,4 ml ^{51}Cr-Chromatlösung werden 12 Stunden vor der Markierung mit 1 ml

einer 10 %igen Ascorbinsäure-Lösung versetzt. 1 ml dieser Lösung wird in der Inkubationsspritze 20 min mit dem ACD-Puffer vorkontaktiert, dann 1 ml Serum dazugezogen und über 30 min inkubiert. Anschließend passiert das Gemisch den IAT. Aus zwei solchen Markierungen werden jeweils 4 ml dem Probanten injiziert und der Aktivitätsgehalt von Blutproben in verschiedenen Zeitabständen nach der Injektion gemessen. Es werden jeweils 2 ml Vollblut abgenommen und die Impulsraten über 10 min im Telefunken-Probenwechsler gemessen. Abb. 26 gibt den Aktivitätsverlauf über eine Zeit bis zu 12 Stunden wieder und zeigt zwei Komponenten, die einer Exponentialfunktion zu folgen scheinen. Mit einem angenommenen Plasmatokrit von 57% werden die Verteilungsräume berechnet. Der erste Verteilungsraum ist erheblich größer als das Plasmavolumen. Das Verhältnis des ersten zum zweiten Verteilungsraum ist kleiner als das Größenverhältnis Plasmavolumen zu Extrazellulärraum (s. Tab. 15) (normalerweise 4,88).

Tabelle 15: Verteilungsräume nach i.v.-Injektion von unter Ascorbinsäure-Zusatz ^{51}Cr-markiertem Serum (s. Text)

Probant	1	2	3	4
Geschlecht	♀	♀	♂	♀
Gewicht kg	51	69	90	55
Größe cm	162	160	176	155
Körperoberfläche m^2 1)	1,525	1,720	2,060	1,525
Dosis /uCi	36	81	81	65
V_1 ml/m^2	4209	2408	4584	3899
V_2 ml/m^2	5780	5205	5833	5945
V_1/PV_{soll}	2,54	1,45	2,76	2,35
V_2/V_1	1,37	2,16	1,27	1,52

1) Nach der Formel von Du Bois und Du Bois
$O = G^{0,425} \times H^{0,725} \times 71,84$ (Körperoberfläche in cm^2)
aus Geigy wiss. Tabellen 7. Aufl. S. 533

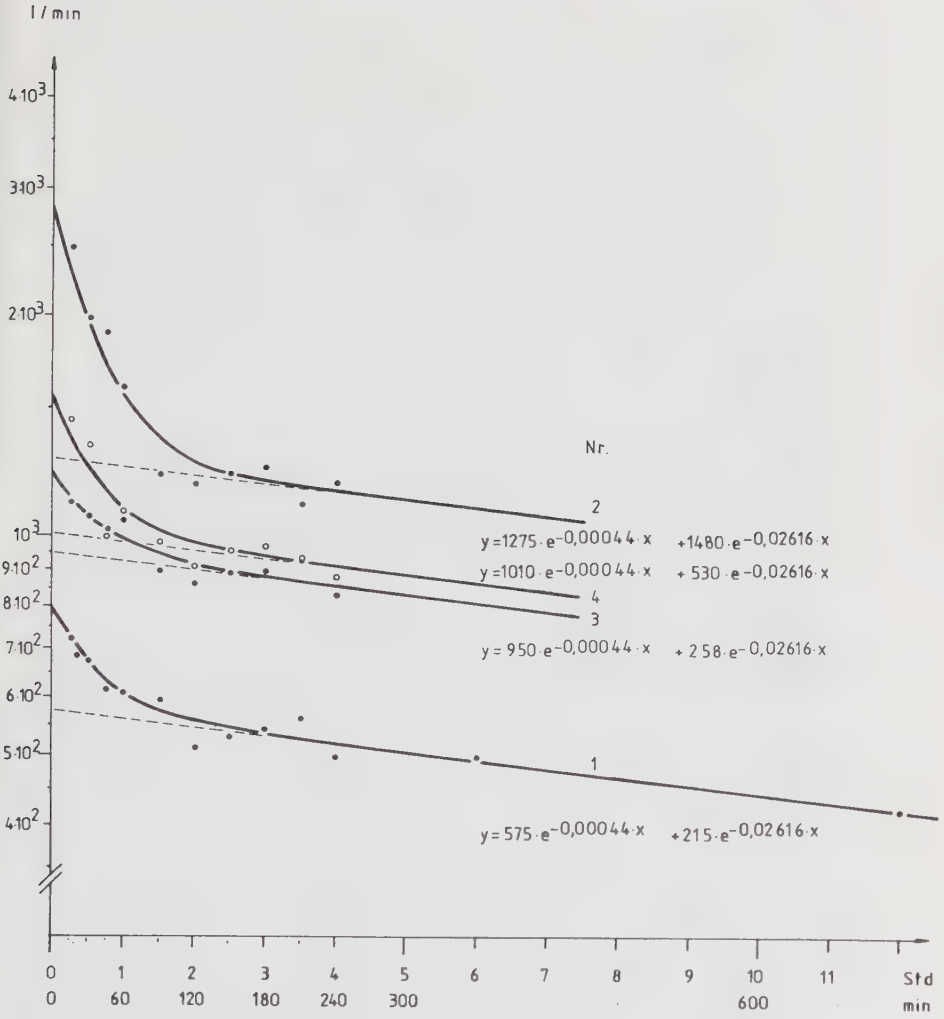


Abb. 26: Aktivitätsverlauf nach i.v.-Injektion von ^{51}Cr-markiertem Serum (12 Stunden Kontakt ^{51}Cr-Chromat-Ascorbinsäure, VKZ 20 min, IKZ 30 min) bei 4 Probanten. Punkte: Aktivität pro 2 ml Vollblut (Einzelwerte). Kurven: graphisch ermittelte Exponentialfunktionen.

5. Diskussion

Die Bestimmung des Blutvolumens ist für viele wissenschaftliche und klinische Fragestellungen sehr bedeutsam; es seien die Schockbehandlung, die extrakorporale Dialyse, der Blutersatz bei großen operativen Eingriffen, die Behandlung verschiedener hämodynamischer Probleme der Kreislaufpathologie und Umsatzbestimmungen in der Hämatologie erwähnt. Dementsprechend sind unzählige Arbeiten über methodische Angaben, über Untersuchungsergebnisse unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen und den daraus resultierenden Erkenntnissen erschienen.

Alle Techniken zur Bestimmung des Blutvolumens beruhen auf dem Prinzip der Verdünnungsanalyse. Eine definierte Menge eines Indikators wird einem unbekannten Volumen zugesetzt. Nach vollständiger Vermischung läßt sich aus der Konzentrationsabnahme des Indikators in einem kleinen Teilvolumen, das aus dem Verteilungsraum entnommen wird, das vorher unbekannte Gesamtvolumen errechnen.

Dieses Vorgehen setzt allerdings voraus, daß der Indikator sich in dem zu bestimmenden Volumen vollständig und homogen verteilt, die Blutbahn während der Versuchszeit nicht verläßt, nicht toxisch ist und meßtechnisch mit geringem Aufwand möglichst genaue Ergebnisse liefert. In vivo wären diese Voraussetzungen jedoch nur im Idealfall erfüllt. Um so verständlicher ist, daß eine Vielzahl von Methoden empfohlen wurden, die jeweils die Unzulänglichkeiten vorausgegangener umgehen sollten.

Sieht man von dem historischen Versuch E. v. Behrings mit Diphterieantitoxin ab, wurden zunächst Farbstoffe wie z.B. Vitalrot (55), Kongorot (15), Indigocyaningrün (90), Geigy-Blau 536 (59) oder Evansblau (T - 1824) (27, 28, 101) eingesetzt. Mit der Anwendung radioaktiver Isotope in der Medizin wurden die Farbstoffindikatoren sowie andere Indikatoren wie z.B. Dextran (101), kolloidales Eosin - Dextran (70) und PVP (13) rasch durch

Radioeisen (39), Radiochromchlorid (36, 22) und radiojodmarkiertes Humanserumalbumin (21, 29, 105) verdrängt. All diesen Indikatorstoffen haftet der entscheidende Nachteil an, daß sie sich in unterschiedlichem Ausmaß und Geschwindigkeit mit dem Extravasalraum ins Gleichgewicht setzen, was bei dessen pathologischer Volumenzunahme besonders relevant wird. Deshalb war die Markierung der korpuskulären Anteile des Blutes naheliegend, was z.B. mit Kohlenmonoxid (92), der Differentialagglutination (3), Radiophosphor (38), Radioeisen (39) und Radiokalium (44) versucht wurde. Diese Indikatoren bieten aber entweder erhebliche meßtechnische Schwierigkeiten oder verlassen die Erythrocyten im Verhältnis zum Untersuchungszeitraum zu rasch (88). Da im Gegensatz zu all den bisher erwähnten Stoffen Radiochrom die oben erhobenen Anforderungen an einen Indikator zur Blutvolumenbestimmung optimal erfüllt, dominierte es bald bei der Erythrocytenmarkierung. Der Markierung von Erythrocyten mit Radiochromat sind deshalb auch besonders viele methodische Untersuchungen gewidmet worden. Auch die vorliegende Arbeit geht einem speziellen Problem nach, das im Zusammenhang mit der Chrommarkierung auftaucht. Zu einem besseren Verständnis sei deshalb die Erythrocytenmarkierung mit Radiochromat ausführlicher besprochen.

1950 fanden Gray und Sterling (33, 35, 95), daß Erythrocyten in 100 ml ca. 20 /ug Chrom (Plasma ca. 14 /ug) enthalten und gewaschen weiteres Chrom aufnehmen, wenn man sie in einer Lösung mit radioaktivem Chromat inkubiert. Sie konnten nachweisen, daß das Radiochrom in der Oxidationsstufe +6 als Chromat-Ion $^{51}CrO_4^{2-}$ durch die Erythrocytenmembran diffundiert, intrazellulär zum Chrom(III)-Ion reduziert und fest an das Hämoglobin gebunden wird. Dies bestätigen auch ihre Untersuchungen, daß eine Markierung von intakten Erythrocyten mit $^{51}CrCl_3$ nur in einem geringen Umfang (1-2 %) möglich ist; dagegen reines Hämoglobin mit 58 % Ausbeute markiert werden kann. Das in Form des

kinetisch inerten Hexaaqua-Komplexes vorliegende Chrom(III)-Ion $Cr(H_2O)_6^{3+}$ soll aus sterischen Gründen nicht in der Lage sein, die Zellmembran zu durchdringen. Der Verlauf und das Reduktionsmittel für die Reduktion des Chroms in den Erythrocyten aus der Oxidationsstufe +6 in die Stufe +3 sind noch weitgehend unbekannt.
Aus den Versuchen von Gray und Sterling, Pearson und Vertrees (79), Malcolm et al. (65) und Schmidt (88) geht hervor, daß innerhalb des Hämoglobins die sehr stabile Bindung des Chroms (33, 76, 7, 79, 89) an den ß-Polypeptidketten des Globins erfolgt, während der Hämanteil frei bleibt. 98 % der intraerythrocytären Aktivität fanden sich an das Hämoglobin gebunden, nur 2 % an das Stroma. Der ^{51}Cr-Einbau erwies sich von zahlreichen Faktoren abhängig: Temperatur und Zeit (33, 18, 97, 10, 86), spezifische Aktivität (33, 10, 86, 74), Hämatocrit (18, 71, 17, 52, 4, 88), pH-Wert (76, 71, 49) und das Inkubationsmedium. Gewaschene Erythrocyten hatten eine geringfügig höhere ^{51}Cr-Aufnahme als ACD-stabilisiertes Vollblut (33, 35, 17, 71, 10). Ein kleiner Anteil des Radiochroms soll danach in Form von Citrat-Komplexen des $^{51}Chrom(III)$-Ions vorliegen (88). Heparin oder reines Citrat eignen sich als Antikoagulans nicht (76, 71, 67), da die Einbauraten wesentlich niedriger sind als im ACD-stabilisierten Plasma (18, 76, 71, 49). $^{51}Chrom$ erfüllt einerseits wegen seiner radiophysikalischen Eigenschaften (physikalische HWZ 27,7 Tage; Emission in 8-9 % der Zerfälle von γ-Strahlung mit 0,323 MeV) (31, 84), seiner geringen Toxicität (bis zu einer Konzentration von 20 µg/Cr/ml Blut sollen die Erythrocyten nicht geschädigt werden) (17, 76, 18) und seiner minimalen "Elution" aus den markierten Erythrocyten (76, 98, 37, 69, 53) nahezu optimal die Anforderungen an einen Radioindikator in der hämatologischen Diagnostik. Andererseits spiegelt sich die Abhängigkeit von den vielen oben angeführten Inkubationsbedingungen in der Anzahl der publizierten Markierungsempfehlungen wider.

Bei den Standardverfahren wird das nicht erythrocytär gebundene Chrom nach der Inkubation durch Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung entfernt. In der Regel werden 10-50 ml Vollblut mit 10-200 /uCi $Na_2{}^{51}CrO_4$ versetzt (95, 34, 18, 76, 82, 17), verschiedene Untersucher benutzen jedoch auch deplasmatisierte Erythrocyten (95, 35, 71, 20, 72, 99). Einige Autoren (98, 9, 97, 102, 5, 32) empfehlen die Inkubation im Brutschrank bei 37°C, um die Inkubationszeit zu verkürzen. Nach dreimaligem Waschen des Inkubates mit kalter physiologischer Kochsalzlösung, wodurch das nicht gebundene Radiochrom möglichst vollständig entfernt werden soll, und gegebenenfalls Resuspension in physiologischer Kochsalzlösung oder Plasma steht die markierte Erythrocytensuspension zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

Da die Waschvorgänge bei den Standardverfahren zeitaufwendig sind, die Erythrocyten nicht gerade schonen und die Sterilität gefährden, wurde empfohlen, ungewaschene Erythrocyten zu verwenden (18, 9, 17, 88), was aber wieder längere Inkubationszeiten zur Reduktion der nichterythrocytär gebundenen Aktivität vor der Injektion und die Messung deplasmatisierter Erythrocyten nach der Durchmischung im Körperkreislauf erforderte - also keinen eigentlichen Gewinn bedeutete.

Als weitere Alternative zu den Waschvorgängen schlugen einige Untersucher das Hinzufügen von Ascorbinsäure nach einer ^{51}Cr-Erythrocyten-Inkubation von 5 bis 30 min vor, da Ascorbinsäure den ^{51}Cr-Einbau in die Erythrocyten in einer Konzentration von 1-5 mg/ml Blut zu blockieren scheint (82, 10, 93, 67, 14). Ascorbinsäure soll Chrom zur dreiwertigen Form reduzieren und ^{51}Cr-Ascorbinat-Komplexe bilden (88). Die Fehlerbreite gegenüber den Standardverfahren ist jedoch deutlich höher (88). Im übrigen gelten die oben beschriebenen Markierungsbedingungen mit ihren doch erheblichen Nachteilen zeitlichen und technischen Aufwandes.

Auch eine Markierung einer Blutkonserve der Gruppe O rh negativ als Vorrat injektionsfertiger markierter Erythrocyten (94, 1, 75, 48) hat sich nicht durchsetzen können, da neben den Gefahren der Serumhepatitis bei der Präparation ebenfalls großer methodischer Aufwand nötig ist. Erst die Verwendung stark basischer Anionenaustauscher (Merck III, Dowex 2 x 8, Amberlite JRA 400) durch Kuni et al. 1963 (61, 62) brachte eine tatsächliche Schnellmethode und damit einen wesentlichen Fortschritt (30), da bei kurzen Inkubationszeiten eine schonende Erythrocytenmarkierung und durch das geschlossene System von Einmalartikeln Sterilität gewährleistet sind. Die o.a. Ionenaustauscher entfernen bei Verwendung der nach der Literatur gebräuchlichen Aktivitäten von 50-100 mCi/mg Cr überschüssige ^{51}Cr-Aktivität aus dem Plasma bis auf einen Rest von 7% (61). Kuni regte wenig später die Herstellung einer Spezialchromatlösung mit einer niedrigen spezifischen Aktivität von 10 mCi/mg Cr an, wodurch er eine weitere Senkung der nichterythrocytär gebundenen Aktivität auf 2-3 % erreichen konnte. Der Fehler, der durch Abstrom der Plasmaeiweiße in den extravasalen Raum entsteht, beträgt selbst bei Markierung mit Nicht-Spezial-Chromatlösung nur noch ca. 7 % des Fehlers bei ausschließlicher Verwendung von Cr-markierten Proteinen. Vergleichende Blutvolumenbestimmungen mit der Schnellmarkierungsmethode und ^{131}J-markiertem Humanalbumin ergaben bei 18 Versuchspersonen eine durchschnittliche Differenz von 6,9 % (62), was zahlreiche andere Autoren mit Anwendung der konventionellen Markierungsmethode ebenfalls beobachteten (6, 87, 105). In Tierversuchen hat Schmidt 1966 (88) bei Vergleichen zwischen den Standardverfahren und der Ionenaustauschermethode nahezu identische Werte erhalten. Die an Plasmaproteine gebundene Restaktivität ist also weitgehend vernachlässigbar.

Ein ganz besonderer Vorteil der Ionenaustauschermethode ist die geringe mechanische Beanspruchung der Erythrocyten bei der Passage an den glatten Austauscherharzkörnern, die sicherlich weit weniger eingreifend ist als mehrfaches

Zentrifugieren für die Waschvorgänge bei den Standardmethoden. Gerade bei Erkrankungen mit pathologisch veränderter Vitalität der korpuskulären Blutbestandteile wie z.B. beim hämolytischen Ikterus ist die schonende Markierung der Erythrocyten für Vitaberechnungen besonders gefragt. Um so wertvoller erscheint der Beweis durch Kuni et al. (62), daß sogar Thrombozyten zahlenmäßig und in ihrer physiologischen Aktivität unverändert den Ionenaustauscher passieren.
Seit der Entwicklung der Standardmethoden und deren methodischen Abwandlungen besteht die Notwendigkeit, die nicht von den Erythrocyten aufgenommene Aktivität (NE ^{51}Cr) möglichst quantitativ zu entfernen, da neben der Ausbeute an markierten Erythrocyten die Reinheit der injektionsfertigen Erythrocytensuspension von nicht erythrocytengebundener Aktivität wesentliches Gütekriterium der Markierung ist. Um ein möglichst reines Endprodukt zu erhalten, ist auf jeden Fall eine Komponententrennung erforderlich, die die Reaktionspartner trennt. In den konventionellen Markierungsprozessen wird diese Aufgabe auf mechanischem Weg durch Zentrifugieren und Dekantieren erledigt, beim Signette-Verfahren übernimmt der basische Anionenaustauscher diese umständlichen Arbeitsschritte der Komponententrennung auf physiko-chemischem Weg. Es galt daher zunächst, die Effizienz, den Austauscheffekt, durch Aktivitätsprofilbilder der Anionenaustauschersäulen zu prüfen. Weniger als durchschnittlich 0,4 % der eingesetzten austauschbaren Aktivität verlassen den Ionenaustauscher (Abb. 18 S.50) (88), ein Bruchteil, der uns veranlaßte, ihn als separate Komponente bei der Betrachtung unserer Ergebnisse auszuschließen. Wir messen diesen vernachlässigbaren, minimalen Rest austauschbaren Chroms gemeinsam mit der Komponente NAT ^{51}Cr. Die Aktivitätsprofilbilder der Ionenaustauscher zeigen weiterhin, daß ihre Aktivitätsverläufe nicht einer einzigen Exponentialkurve entsprechen. Es ist die Frage zu stellen, ob während des Markierungsvorganges mehrere Reaktionsprodukte entstehen, die vom Ionenaustauscher gebunden werden können. Schließt

man unmittelbar an die erste Passage eine zweite an, so zeigt der Aktivitätsverlauf in der zweiten gespülten Ionenaustauschersäule noch mindestens eine weitere, dritte Komponente. Sie wird aber wahrscheinlich durch unspezifische Sorption festgehalten. Besonders im Profilbild des zweiten IAT wird deutlich, welcher Aktivitätsanteil auf die Schlauchstücke entfällt, die die Kunststoff-Vlies-Pfropfen enthalten, mit denen der IAT festgehalten wird. Betrachtet man die Bilanz zwischen der eingesetzten Aktivität und der jeweils von den Austauschern aufgenommenen Aktivität, so ergibt sich, daß beim Ausspülen des zweiten IAT-Schlauches eine bezogen auf die dort eingesetzte Aktivität eine ungefähr doppelt so große Aktivitätsmenge ausgespült werden kann. Daraus folgt, daß die Aktivität der Spülflüssigkeit nicht nur Totraum repräsentiert, sondern als unspezifisch adsorbierte Aktivität wieder ausgespült wurde. Als weiteren Hinweis für diese dritte Komponente, die adsorbiert und durch den Spülvorgang "frei" wird, ist das geringer abnehmende NE ^{51}Cr nach der 2. Passage als dem Aktivitätsverlauf im 2. Ionenaustauscher entsprechen würde. Die Aktivitätsprofile verlaufen zunehmend flacher und nähern sich einer Basislinie (Abb. 19 S. 51). Um den Einfluß des NE ^{51}Cr auf den Verlauf im IAT deutlich zu machen, wurde eine VKZ von 60 min zur Provokation von hohen NE ^{51}Cr-Werten gewählt. Gegenüberstellungen der Aktivitätsprofile zeigen ausschließlich im 2. Teil des zweiten IAT entsprechende Unterschiede. Die Kurvenanalyse der Aktivitätsprofile macht zunächst für zwei Komponenten exponentiellen Verlauf und damit Ionenaustausch wahrscheinlich, während die dritte Komponente durch Sorption für die Aktivität in den Pfropfen und die Basisaktivität verantwortlich zu sein scheint. Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine weitere Komponente existieren könnte, die mit dem IAT keine Wechselwirkung eingeht und sich damit bei dieser Methode der Komponententrennung dem Nachweis entziehen würde.

Die bereits erwähnten konventionellen Verfahren zur Komponententrennung durch Zentrifugieren und Dekantieren eignen sich auch, um das NAT ^{51}Cr in die E ^{51}Cr- und NE ^{51}Cr-Anteile aufzutrennen. Besonders ausführlich haben sich Seifert und Meßmer (91) mit dem NE ^{51}Cr auseinandergesetzt. Bei der Überprüfung ihrer Arbeitsergebnisse konnten wir uns weder entschließen ihre Nomenklatur zu übernehmen noch ihre Methode. Bei der Messung der von ihnen sog. freien Chromrate, also des NE ^{51}Cr, wurden 0,5 ml der Blutflüssigkeit nach IAT-Passage im Bohrloch gemessen, also ca. 10 µCi (!). Bei den seinerzeit verwendeten Meßgeräten dürfte die resultierende Impulsrate nicht mehr im linearen Meßbereich der Apparaturen gelegen haben. Die Auswirkungen dieses Zählverlustes auf das Endergebnis wird noch dadurch verstärkt, daß die 0,5 ml unter etwas ungünstigeren Bedingungen gemessen wurden als die 0,2 ml Plasma nach IAT-Passage. Da die Meßgeometrie im Bohrloch ohnehin den 4pi-Wert nur im Idealfall erreicht, wäre um so dringender eine Beachtung der unterschiedlichen Volumina bzw. wenigstens eine Korrektur der gemessenen Impulsraten gewesen, um reale Werte zu erhalten.
Wir haben durch Suspension von 20 µl Blutflüssigkeit in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung bzw. Phosphat-Puffer dieselbe Meßgeometrie eingehalten wie bei der Messung des dekantierten Überstandes. Durch die kleine Probenmenge lag die Impulsrate im linearen Bereich des Zählers. Ein etwaiger Pipettierfehler ging in das Ergebnis nicht ein, da der Ansatz selbst nach seiner ersten Messung zentrifugiert und dekantiert wurde. Nach der ersten Messung wurde vor der Zentrifugation das Probenvolumen um 50% vermehrt, um danach das ursprüngliche Volumen sicher vom Bodensatz dekantieren zu können.
Es sei hervorgehoben, daß trotz dieser Vorsichtsmaßnahme Ergebnisse mit ausreichender Präzision nur bei Zentrifugen mit einwandfreiem Rundlauf auch im kritischen Drehzahlbereich erreicht werden.

Von einer Hämolyse ist theoretisch ein erhöhter NE ^{51}Cr-Wert zu erwarten. Wir haben deshalb die sehr empfindliche Methode für den Nachweis von freiem Hämoglobin aufgebaut und damit sowohl Phosphat-Puffer als auch physiologische Kochsalzlösung als Suspensionsmedien über bis zu 14 Stunden Suspensionszeit überprüft. Hierbei fanden wir ebensowenig eine über den Normbereich von 5 bis 40 mg pro 100 ml Serum (83) hinausgehende freie Hämoglobinkonzentration wie bei Variation der VKZ von 5 bis 30 min und einer IKZ von 10 und 20 min innerhalb der normalen Markierungsprozeduren sowie nach längerer venöser Stauung bis zu 5 min (Tab. 3 S.22). Sieht man von Versuchsbedingungen ab, bei denen durch extreme Maßnahmen geradezu eine Hämolyse provoziert wird (wie z.B. bei Seifert und Meßmer durch Hinzufügen des in Aqua dest. gelösten Na-Chromats zum Blut ohne Auflösung des Puffergranulats wider die Arbeitsvorschrift),kann davon ausgegangen werden, daß eine (Spontan-)Hämolyse keinen Beitrag zum NE ^{51}Cr liefert. Die Vermutung Seiferts und Meßmers, daß eine Hämolyse durch ACD ebenso wie durch Na-Chromat in Aqua dest. hervorgerufen wird und dadurch eine Erhöhung des NE ^{51}Cr bewirkt wird, scheint auch durch ihre eigenen Arbeitsergebnisse widerlegt zu werden, nach denen eine mit Aqua bidest. bewußt bewirkte Hämolyse bis zu von Seifert und Meßmer gemessenen Werten von 463 mg % nicht nur ohne Anstieg des NE ^{51}Cr sondern im Gegenteil mit niedrigeren NE ^{51}Cr-Werten einhergingen. Über die von Seifert und Meßmer verwendete Meßmethode für das freie Hämoglobin ist ihrer Publikation nichts zu entnehmen. Da die Literatur über die optimale Eignung von ACD-Puffer zur Konservierung von Erythrocyten Legion ist, (18, 76, 9, 17, 97, 49, 54, 64, 96, 85, 19, 68, 102, 80, 40, 103, 66) eine durch ihn provozierte Hämolyse anderweitig nicht beschrieben wurde und nach unserer Kenntnis auch Blutbanken auf die Arbeit von Seifert und Meßmer hin nicht auf die Verwendung von ACD abgegangen sind, sehen auch wir keinen Grund, von dem ACD als optimalem Antikoagulans bei der Markierung von Erythrocyten abzugehen.

Bereits bei den konventionellen Markierungsverfahren war die Tatsache hervorgehoben worden, daß das Chromat-Ion aufgrund seines relativ hohen Redoxpotentials von $E_{oCrO_4^{2-}/Cr^{+3}}$ = +1,36 Volt (gegen die Kalomelelektrode) (47) relativ leicht zum Chrom(III)-Ion reduziert wird und in dieser Form auch Plasma-Protein-Bindungen eingeht (34, 33, 22, 36, 81, 93, 23, 8]. Dabei scheint keine spezifische Affinität zu einzelnen Plasma-Proteinen zu bestehen (42). Um abzuklären, in wieweit das NE ^{51}Cr aus proteingebundenem (reduziertem) Chrom besteht, haben wir Untersuchungen mit Elektrophorese, Ultrafiltration und äthanolischer Fällung durchgeführt. Die Elektrophorese-Versuche (Tab. 10, S.43, Tab. 11,S.44, Tab. 12, S.45) zeigen, daß nach Vorkontakt des Chromats mit ACD-Puffer von 30 Minuten sich die Aktivitätsmenge, die geringfügig von der Auftragsstelle zur Anode wandert, sich von etwa 10 % auf 20 % der eingesetzten Gesamtmenge verdoppelt. Der überwiegende Teil wandert erwartungsgemäß relativ rasch zur Anode. Nur ein vernachlässigbarer Anteil der Auftragsmenge verläßt die Auftragsstelle zur Kathode. Nach IAT-Passage ist von der langsam wandernden Komponente etwa das fünffache gegenüber der schnellen Komponente übriggeblieben, bezogen auf ihre Ausgangsaktivität vor Passage sind es jedoch nur wenige Prozente. Wir schließen daraus, daß das durch Hinzufügen des ACD-Puffers reduzierte Chrom zum größten Teil in einer anionischen und damit ionenaustauschbaren Form vorliegt. Dabei dürfte es sich um Citrat-Komplexe des Chrom(III)-Ions (60, 78, 100) handeln. Diesen Schluß zieht auch Schmidt (88), der in ähnlichen Versuchen durch Papier-Radioelektrophorese eine Aktivitätsbande nachweist, die rascher als die Proteine zur Anode wandert, jedoch nicht so weit wie das Chromat-Ion und mit der IKZ zunimmt. Die von uns nachgewiesenen Aktivitätsanteile, die rascher als Chromat-Ionen wandern, konnten in seinen Versuchen nicht gefunden werden, da aufgrund der Laufzeit das Chromat-Ion das anodische Streifenende bereits erreicht

hatte. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die nach IAT-Passage an der Auftragsstelle vorgefundene Aktivität von einem weiteren ungeladenen Citrat-Komplex herrührt. Nach Zusatz von Serum und auch Vollblut zeigen sich weitere rascher laufende anionische Komponenten, die nach IAT-Passage nicht mehr nachweisbar sind.
Da aufgrund der Wanderungsgeschwindigkeiten in der Elektrophorese nicht proteingebundenes Chrom von etwa proteingebundenem Chrom nicht in allen Banden unterschieden werden konnte, haben wir den proteingebundenen Anteil mit Ultrafiltration und äthanolischer Eiweißfällung untersucht. Dabei fanden wir mit zunehmender IKZ einen zunehmenden Anteil der nicht dialysierbaren Aktivität (Abb. 17, S.46), was wir als zunehmende Proteinbindung interpretieren. Weiterhin nimmt der Dialysegradient mit zunehmender IKZ ab, woraus wir schließen, daß die Proteinbindung zunehmend fester wird. Diese Annahme wird gestützt durch die Ergebnisse der äthanolischen Fällung (Tab. 13, S.46): nur weniger als 10 % der nicht dialysierbaren Aktivität sind so fest an das Protein gebunden, daß sie nach äthanol. Fällung und zweimaligem Waschen gebunden bleiben. Aber auch dieser kleine Anteil einer sehr festen Proteinbindung nimmt bei der Steigerung der IKZ von 5 auf 120 min ebenso wie die nicht dialysierbare Aktivität um etwa den Faktor zwei zu. Auch der größere Anteil der lockeren Proteinbindung macht abhängig von der IKZ nicht mehr als 30 bis 50 % des NE ^{51}Cr aus. Offensichtlich muß die in früheren Arbeiten diskutierte Annahme, daß das reduzierte Chrom (33, 34, 22, 36, 82, 17, 10) praktisch in völliger, wenn auch lockerer Bindung vorliegt, revidiert werden. Andererseits können wir auch Seifert und Meßmer nicht folgen, die zunächst "Chromat mit Ascorbinsäure reduzierten und mit Proteinen inkubierten, danach mit Trichloressigsäure fällten und danach zweimal wuschen und aus der Tatsache, daß sie in dem Niederschlag keine Aktivität fanden, den Schluß zogen, daß reduziertes Chrom nicht von Protein gebunden wird". Wir werden noch anhand weiterer in vivo Untersuchungen demonstrieren, daß die von uns nachgewiesene

lockere Protein-Bindung des reduzierten Chroms sehr wohl für das intravasale Verweilen der Aktivität relevant ist. Auf die Frage, ob und inwieweit Ascorbinsäure Chromat reduziert, wird ebenfalls noch eingegangen.
Nach den aus der Literatur geläufigen Vorstellungen wird eine gewisse Menge des Chromats während des Markierungsvorgangs reduziert und dann (teilweise) von Proteinen gebunden (81, 82, 10, 12, 50, 62).
Wir haben zunächst am Analogrechner (56) ein kinetisches Modell programmiert (Abb. 22, S.55, Abb. 23, S.56), das diesen Vorstellungen entspricht. Es ist charakterisiert dadurch, daß die eine Substanz aus der anderen hervorgeht (Kettenmodell). Wir haben die Summenkurve aller Compartments, die nicht erythrocytengebundene Aktivität darstellten, der von uns gemessenen Abhängigkeit des NE ^{51}Cr von der IKZ gegenübergestellt. Wir konnten durch keinerlei Variation der verschiedenen Einstellwerte die Analogrechnerkurve in Deckung bringen. Auch nach Modifikation des Modells, die eine Verzweigung im Substanzfluß vorsah, gelang der Kurvenangleich nicht. Erst eine weitere dritte Modifikation, die zu einem kompletten Verzweigungsmodell (Abb. 24, S.57) führte, ließ einen befriedigenden Angleich an die experimentellen Werte zu (Abb. 25, S.58). Aus diesen Untersuchungen müssen wir den Schluß ziehen, daß aus dem reduzierten Chrom mindestens drei weitere Substanzen entstehen, wobei die Konzentration der ersten Substanz mit zunehmender IKZ zugunsten der beiden weiteren Substanzen abnimmt. Die Mengenanteile sowie die Geschwindigkeit, mit der sich ihre Konzentrationen ändern, sind bei zwei dieser Substanzen vergleichbar mit den Werten, die wir aus dem leicht und fester gebundenen Chrom in den Dialyse- und Fällungsversuchen gefunden hatten.

Im folgenden sollen nun die einzelnen Schritte des Markierungsvorganges unter besonderer Berücksichtigung der Entstehung des NE ^{51}Cr diskutiert werden. Aus Abb. 9 S.27 geht hervor, daß die spezifische Aktivität einen

entscheidenden Einfluß hat, was bei der stöchiometrischen Abhängigkeit der Reduktion zu erwarten war. Aus diesem Grund wird für die Signette-Methode empfohlen, ausschließlich Radiochrom zu verwenden, dessen spezifische Aktivität 10 mCi/mg Cr nicht überschreitet. Das üblicherweise in physiologischer Kochsalzlösung zu beziehende Chromat für konventionelle Markierungsmethoden wird in stark unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten angeboten.

Aus der gleichen Abbildung geht hervor, daß im Bereich einer spezifischen Aktivität zwischen 100 und 200 mCi/mg eine Änderung der spezifischen Aktivität eine größere Änderung des NE ^{51}Cr-Wertes bewirkt als zwischen 10 und 100 mCi/mg. Aus diesem Grund erscheint es wichtig zu wissen, daß es wenig sinnvoll ist, das NE ^{51}Cr durch eine weitere Verringerung der spezifischen Aktivität vermindern zu wollen, zumal man dann auch eher Gefahr läuft, besonders bei niedrigen Hämatokrit-Werten, die Toxizitätsschwelle für Radiochrom zu überschreiten. Die Erythrocyten werden bis zu einer Konzentration von 20 µgCr/ml Blut nicht geschädigt, höhere Konzentrationen können jedoch zu Hämolyse und einer Verkürzung der Erythrocytenlebenszeit führen (89).

Je nach Lagerzeit ergibt sich eine weitere Varianz der spezifischen Aktivität. Verwendet man wie Seifert und Meßmer solche Chromatlösungen ohne die jeweilige spezifische Aktivität zu beachten und einzustellen, lassen sich beliebige Werte des NE ^{51}Cr erreichen. Vielleicht ist dies auch eine Erklärung für die sich teilweise widersprechenden Ergebnisse dieser Autoren. Von dieser Einzelheit abgesehen besteht bei Berücksichtigung der spezifischen Aktivität bzw. jeweils gleicher Chrom-Mengen ungeachtet der jeweils vorliegenden Aktivität kein signifikanter Zusammenhang zwischen Lagerzeit und NE ^{51}Cr (Tab. 4, S. 29).

Im übrigen zeigt Abb. 10, S.28, daß auch bei optimaler spezifischer Aktivität das NE ^{51}Cr bei steigender Vorkontaktzeit zunimmt, wobei die Kinetikkurve auch wieder auf zwei Komponenten im Entstehungsmechanismus des NE ^{51}Cr hinweist. Aus den oben zitierten Untersuchungen müssen wir annehmen, daß durch die Bildung verschiedener Chrom-Citrat-Komplexe das Redoxgleichgewicht immer wieder zuungunsten des reduzierten Chroms verschoben wird. Die Konsequenz aus dieser Beobachtung ist, daß im praktischen Ablauf die Vorkontaktzeit so kurz wie möglich gehalten wird. Der bei den konventionellen Markierungsmethoden beschrittene Weg, einen Vorkontakt dadurch ganz zu vermeiden, daß man den Radioindikator erst nach Vermischung mit dem Antikoagulans ACD hinzufügt, scheidet beim IAT-Verfahren aus. Der Zwang, mit möglichst niedriger Aktivität zu arbeiten, bedeutet bei einem aus technischen Gründen begrenzten Markierungsflüssigkeitsvolumen, daß das Erythrocytenvolumen möglichst hoch gehalten werden muß. Da die dem Blut hinzugefügten Zusätze wegen der zu beachtenden Osmolarität und der Manipulationsgenauigkeit nicht beliebig verringerbar sind, ist der gewählte Markierungsablauf sicher nicht wesentlich zu verbessern. Zudem ist der Reduktionsvorgang des Chromats auch bei maximaler Verkürzung der Vorkontaktzeit nicht ganz auszuschalten. Abb. 4, S.15 zeigt, daß auch durch eine (virtuelle) VKZ von 0 Minuten das NE ^{51}Cr nicht auszuschalten ist. Bei üblicher Arbeitsweise dürfte die VKZ in der Regel unter 10 min zu halten sein. Dies bewirkt eine Zunahme des NE ^{51}Cr von 0,5 %.

Aus technischen Gründen sind beachtliche Streuungen der Puffermengen in der Inkubationsspritze unvermeidlich, bei unsachgemäßem Umgang können sie noch dadurch verstärkt werden, daß bei Abziehen der Spritzenkappe und entsprechender Haltung der Spritze Puffergranulat zusätzlich verlorengeht. Die Abhängigkeit des NE ^{51}Cr vom Puffergewicht ist allerdings auch bis zu einer Reduktion der Puffermenge weit unter die Hälfte der normalen Spritzen-

füllung nicht wesentlich beeinträchtigt. Auch bei extremer und unter Praxisbedingungen unrealistischer Reduktion der Puffermenge kommt es zu keinem problematischen Anstieg des NE ^{51}Cr. Die Zunahme des NE ^{51}Cr bei abweichenden Puffermengen ist vermutlich auf pH-Verschiebungen zurückzuführen. Korreliert man die resultierenden pH-Werte mit NE ^{51}Cr, so zeigt sich,daß offensichtlich bei der normalerweise verwendeten Puffermenge unter dem damit erzielten pH-Wert ein breites Optimum vorliegt, das pH-Werte zwischen 6,1 und 6,6 (in der Inkubationsspritze) ohne wesentliche Änderung des NE ^{51}Cr umspannt (Abb. 11, S.31, Abb. 12, S.32). Den Ergebnissen von Seifert und Meßmer hinsichtlich der pH-Abhängigkeit des NE ^{51}Cr weiter nachzugehen, erschien uns nicht lohnend. Auch diese Autoren haben eine nennenswerte Zunahme des NE ^{51}Cr lediglich bei einer Verschiebung in alkalische Bereiche von pH 7,5 bis 8,0 erzielt, die auch in extremen klinischen Situationen wohl nie zu beobachten sind.

Betrachtet man die Veränderung des E ^{51}Cr mit der IKZ, so fällt auf, daß unabhängig von der VKZ das Chrom mit einer Halbwertszeit von 10,0 min (Abb. 4, S.15) in die Erythrocyten einströmt. Eine Rückextrapolation des von uns ab der IKZ von 5 min beobachteten Verlaufes für eine IKZ von 0 min führt zu einem E ^{51}Cr-Wert von 49 % bei einer VKZ von 10 min (Abb. 3, S.14), welcher ja erheblich vom 0-Wert abweicht. Die Abnahme dieses Wertes mit zunehmender VKZ macht wahrscheinlich, daß dieser Wert den Anteil des frei diffusiblen Chromates bedeutet, das in vernachlässigbar kurzer Zeit durch die Erythrocytenmembran in den Erythrocyten hineindiffundiert.

Die Differenz zwischen E $^{51}Cr_o$ (auf eine IKZ von 0 min zurückextrapolierter Wert) und E $^{51}Cr_{max}$ beträgt unabhängig von der VKZ 7,9 % der Gesamtaktivität. Auch die Geschwindigkeit, mit der NAT ^{51}Cr auf den Maximalwert zustrebt, erscheint unabhängig von der VKZ gleich zu sein (Abb. 4, S.15).

Folgende Überlegung führt darauf hin, daß es sich bei der Differenzaktivität zwischen E $^{51}Cr_o$ und E $^{51}Cr_{max}$ nicht um die zusätzliche Aufnahme von Chromat-Ionen handeln kann: steht nach einer längeren VKZ den Erythrocyten bereits initial weniger Chromat zur Verfügung, müßte sich auch der zusätzlich von den Erythrocyten aufgenommene Chromanteil proportional erniedrigen. Wir vermuten deshalb, daß es sich vielmehr um einen anionischen Chrom(III)-Citrat-Komplex handelt, der in die Erythrocyten mit einer Halbwertszeit von 10,0 min hineindiffundieren kann bzw. in den Erythrocyten mit dieser Halbwertszeit das Chrom an andere Bindungen so verliert, daß die Aktivität die Erythrocyten nicht mehr verlassen kann. Der hohe Wert des E $^{51}Cr_o$ zeigt, daß Chromat-Anionen mit einer wesentlich kürzeren Halbwertszeit die Erythrocyten-Membran permeieren und reduziert werden.
Besonders sei darauf hingewiesen, daß der Maximalwert des E ^{51}Cr mit zunehmender VKZ viel stärker abnimmt als es der Zunahme des NE ^{51}Cr entspricht. Geht man von der Annahme aus, daß auch reduziertes Chrom in Form anionischer und oder neutraler Chrom-Citrat-Komplexe in die Erythrocyten eindringen kann, sind auch die Ergebnisse zu erklären, nach denen mit zunehmender IKZ das NE ^{51}Cr weiter abfällt (Abb. 1, S.12). Wenn mit zunehmender Zeit Citrat intraerythrocytär Chrom verloren hat und in das Plasma zurückdiffundiert ist, kann es dort zum Teil von anderen Komplexen das Chrom mit unterschiedlicher Geschwindigkeit je nach Komplex übernehmen (und damit wieder in Erythrocyten diffundieren).
Unsere Befunde haben jedenfalls gezeigt, daß Citrat offensichtlich gut die Erythrocytenmembran passieren kann. Darüberhinaus zeigen die Beobachtungen von Mundschenk und Fischer (74), daß auch im (nach zweimaligem Waschen) sicher citratfreien Milieu bei der zur Rede stehenden spezifischen Aktivität einige Prozent des $^{51}Cr^{+++}$ in einer Halbwertszeit von einigen Minuten in die Erythrocyten aufgenommen wird. Eventuell ist der erste Abfall der NE ^{51}Cr-Kurven auf einen solchen Vorgang zurückzuführen.

Auch der Aktivitätsverlauf im IAT-Schlauch muß nach diesen Beobachtungen in anderem Licht erscheinen. Geht man von einem ionischen ^{51}Cr-Citrat-Komplex aus, der sich intra- und extraerythrocytär ins Gleichgewicht setzt, wird bei IAT-Passage zunächst die (extraerythrocytäre) Aktivität rascher abnehmen bis durch den wachsenden extra-intrazellulären Gradienten soviel Komplex nachdiffundiert, daß er den Konzentrationsabfall langsamer verlaufen läßt (offenes Zwei-Kammermodell). In der kurzen Pause des Umsetzens auf den zweiten IAT bei dem in Abb. 18, S.50 (Kapitel 4.2.1.4) gezeigten Experiment stellt sich wieder kurzfristig das extra-intra-zelluläre Gleichgewicht ein, was zu einem absoluten Aktivitätsanstieg extrazellulär führt. Ein analoger Vorgang dürfte sich bei konventioneller Komponententrennung abspielen: durch mehrfaches Waschen ist das NE ^{51}Cr nicht so zu reduzieren, wie das theoretisch durch den Waschеffekt unter Berücksichtigung der extraerythrocytären Flüssigkeit nach Zentrifugation zu erwarten wäre (11, 74, 26, 88). In dieses Bild paßt auch, daß sich nach Hämolyse markierter Erythrocyten ein Anteil von 8 % der Aktivität ohne Proteinbindung (88) findet.
Darüberhinaus zeigen Abb. 1, S.12 und Abb. 28, S.84, daß nach längerer VKZ das NE ^{51}Cr mit zunehmender IKZ stärker abnimmt, der oben diskutierte Citrat-Transport-Prozeß also von der Konzentration des ^{51}Chrom(III)-Citrat-Komplexes, abzuhängen scheint. Unabhängig von der VKZ nimmt das NE ^{51}Cr mit der IKZ ab (Abb. 1, S.12). Die Geschwindigkeit der Abnahme ist offensichtlich der Ausdruck der Summe von unterschiedlich rasch abnehmenden (und zum Teil zwischenzeitlich zunehmenden) Komponenten, die verschiedenen $^{51}Cr^{+++}$-Citrat- sowie -Protein-Komplexen entsprechen dürften. Nach der in der Originalmethode empfohlenen IKZ von 7 min nimmt das NE ^{51}Cr wesentlich langsamer ab als zuvor, so daß eine weitere Verlängerung der IKZ keine wesentliche Qualitätsverbesserung des Markierungsproduktes bewirkt.

Über die eigentlichen Markierungsbedingungen hinaus können auch externe Faktoren das NE ^{51}Cr beeinflussen, wie 1. Hämatokrit, 2. pH-Wert, 3. reduzierende Substanzen. Bereits Seifert und Meßmer haben gefunden, daß der Hämatokrit keinen wesentlichen Einfluß hat. Dies ist auch theoretisch zu erwarten gewesen, da wie auch unsere Versuche im einzelnen belegen in die Erythrocyten die Aktivität aufgenommen wird, die nach entsprechenden chemischen Vorgängen dafür zur Verfügung steht. Über die pH-Abhängigkeit der Markierungsausbeute haben schon zahlreiche Autoren (18, 76, 77, 17, 71, 54, 68, 80, 25, 51) berichtet. Wir haben gezeigt, daß unter den üblichen Markierungsbedingungen nicht nur ein optimal niedriges NE ^{51}Cr erzielt wird, sondern eine nennenswerte Zunahme des NE ^{51}Cr erst bei extremen pH-Verschiebungen auftritt (Abb. 12, S.32), wie sie auch in extremen klinischen Situationen nicht nur nicht zu beobachten sondern auch nicht mit dem Leben zu vereinbaren sind. Angesichts der sehr lockeren Protein-Bindung des reduzierten ^{51}Cr messen wir auch einer Zunahme der Protein-Konzentration keinen wesentlichen Einfluß bei, zumal die Proteinbindung bei langen IKZ relevant wird. Die von Seifert und Meßmer beobachtete starke Erhöhung des NE ^{51}Cr bei extremer Vermehrung der Proteinkonzentration hat nach unserer Auffassung keine klinische Relevanz. Diese Autoren erhöhten die Proteinkonzentration durch Zusatz von Albumin auf Werte wie sie in der Klinik kaum vorkommen, und zudem ausschließlich durch Vermehrung wesentlich größer molekularer Paraproteine bewirkt werden. Hier dürfte es durch Erhöhung der Osmolarität zu Veränderungen an den Erythrocyten mit entsprechenden Folgen gekommen sein.
Dagegen kommt reduzierenden Substanzen im Blut eine größere Bedeutung zu (106, 73). Schon die Versuche von Seifert und Meßmer mit in vitro-Zusatz von Ascorbinsäure haben gezeigt, daß auch ein großer Ascorbinsäure-Zusatz keineswegs die Chrom-Markierung von Erythrocyten unterbindet. Untersucht man unter realistischen Bedingungen, nämlich

in vivo-Applikation, so zeigt sich, daß nach hohen iv.-Dosen eine bemerkenswerte Vermehrung des NE ^{51}Cr auftritt (Abb. 14, S.37). Aber auch nach Dosen bis zu 2,5 g iv. ist bereits 30 min nach Applikation das NE ^{51}Cr nur auf Werte um etwa das doppelte angestiegen (ca. 5 %). Eine extreme orale Dose von 10 g (43, 16) ließ nach einer mit der Literatur (58, 24) gut übereinstimmenden Resorptionszeit von 3 Stunden einen geringfügigen Anstieg des NE ^{51}Cr von 2,5 auf 4 % erkennen. Reduzierende Aminosäuren hatten auch in extremen Dosen keinen sicheren Effekt (Abb. 15, S.38). Die Anstiege des NE ^{51}Cr nach ihrer Applikation bewegten sich in Größenordnungen, wie wir sie als spontane Schwankungen innerhalb von 24 Stunden beobachten konnten (Abb. 16, S.40).

Wenn sich die Frage nach der Auswirkung des NE ^{51}Cr auf die Qualität einer Blutvolumen-Bestimmung stellt, ist zu beachten, daß die Ergebnisse einer Blutvolumen-Bestimmung in der Klinik üblicherweise an den Sollwerten gemessen werden, die anhand von Körpergröße und -gewicht geschätzt werden müssen. Je nach Konstellation dieser Parameter ist dabei mit einer Streuung zwischen 8 und 12 % zu rechnen. Nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz ist es im allgemeinen unrentabel, mit einem großen Aufwand einen Fehler wesentlich unter die Hälfte des jeweils nicht veränderbaren maximalen Fehlers zu drücken. Damit sind Schwankungen im NE ^{51}Cr, wie sie unter Praxis-Bedingungen auftreten, irrelevant. Darüberhinaus trifft die Annahme von Seifert und Meßmer nicht zu, daß Schwankungen des NE ^{51}Cr in vollem Umfang in das Meßergebnis des Blutvolumens eingehen. Zum Beweis ihrer These haben diese Autoren das NE ^{51}Cr unter anderem durch Verwendung von EDTA als Antikoagulans erhöht (also unter methodenwidrigen Bedingungen). Da der resultierende ^{51}Cr-EDTA-Komplex (63, 45) glomerulär filtriert wird, ist der resultierende Blutvolumen-Fehler trivial. Im übrigen liegen die mit der Signette-Methode (wobei vermutlich mit Chrom ungeeigneter spezifischer Aktivität gearbeitet wurde) erzielten Blutvolumen-Werte im gleichen Volumen-Bereich,

der bei Verwendung konventionell markierter Erythrocyten bei (anderen) Hunden gemessen wurde. Die Ergebnisse weisen enorme Streuungen auf, wie sie bei Blutvolumenbestimmungen bei normalen Hunden völlig ungewöhnlich sind. Deshalb messen wir der signifikanten Abweichung des Mittelwertes der Stichproben von 5 Hunden, die mit der Signette-Methode untersucht wurden, nicht die gleiche Bedeutung zu wie die Autoren. Die übergroße Streuung mag den Autoren entgangen sein, da sie in der Arbeit die Streuung des Mittelwertes als Streuung angegeben haben.

Das in-vivo-Verhalten des NE ^{51}Cr (Abb. 26, S.61) bestätigt nicht nur, daß es aus mindestens zwei Komponenten besteht, sondern demonstriert auch für einen überwiegenden Anteil von etwa 2/3 der Aktivitätskonzentration (Tab. 15, S.60) nach Verteilung im Körper ein langes Verweilen im Blut mit einer Halbwertszeit von mehr als 24 Stunden (46). Daraus folgt, daß das NE ^{51}Cr nur zu einem geringeren Teil während der bei der Blutvolumenbestimmung üblicherweise verwendeten Durchmischungszeit bis zu einer Stunde beeinflussen kann, also beispielsweise bei einem NE ^{51}Cr von 3 % nur etwa 1 %. In der Auswirkung auf klinische Ergebnisse kann das NE ^{51}Cr damit für eine Blutvolumenbestimmung ebenso wie für eine Erythrocytenlebenszeit-Bestimmung vernachlässigt werden.

Um für extreme Ansprüche an die Methode, wie sie beispielsweise in experimentellen Anwendungen denkbar sind, eine Abschätzung zu ermöglichen, ob und unter welchen Markierungsbedingungen die mit der Schnellmarkierungs-Methode erreichbare Qualität ausreichend ist, haben wir ein Nomogramm erarbeitet, mit dessen Hilfe für eine gegebene VKZ und IKZ das resultierende E ^{51}Cr und NE ^{51}Cr abgeschätzt werden können. Zur Erstellung dieses Nomogrammes haben wir zunächst die Korrelation zwischen IKZ und der Steigung der Geraden ermittelt, die alle bei gleicher IKZ in Abhängigkeit von der VKZ auftretende E ^{51}Cr- und NE ^{51}Cr-Werte verbindet. Die Korrelation ließ sich am besten durch ein Polynom zweiten Grades beschreiben (Abb. 27, S.83). Weiterhin wurde der Mittel-

wert des y-Achsenabschnittes dieser Geraden ermittelt. Ausgehend von diesem mittleren y-Achsenabschnitt und den durch das Polynom beschriebenen Steigungen ergab sich eine Geraden-Schar in Abhängigkeit von IKZ. Dieser Geraden-Schar überlagert wurden die Polynome zweiten Grades, die für die verschiedenen VKZ die NE ^{51}Cr- und zugehörigen E ^{51}Cr-Werte optimal beschreiben. Das resultierende Nomogramm ist in Abb. 28, S.84) wiedergegeben und erlaubt eine befriedigende Vorhersage der zu erwartenden Markierungs-Qualität von IKZ und VKZ.

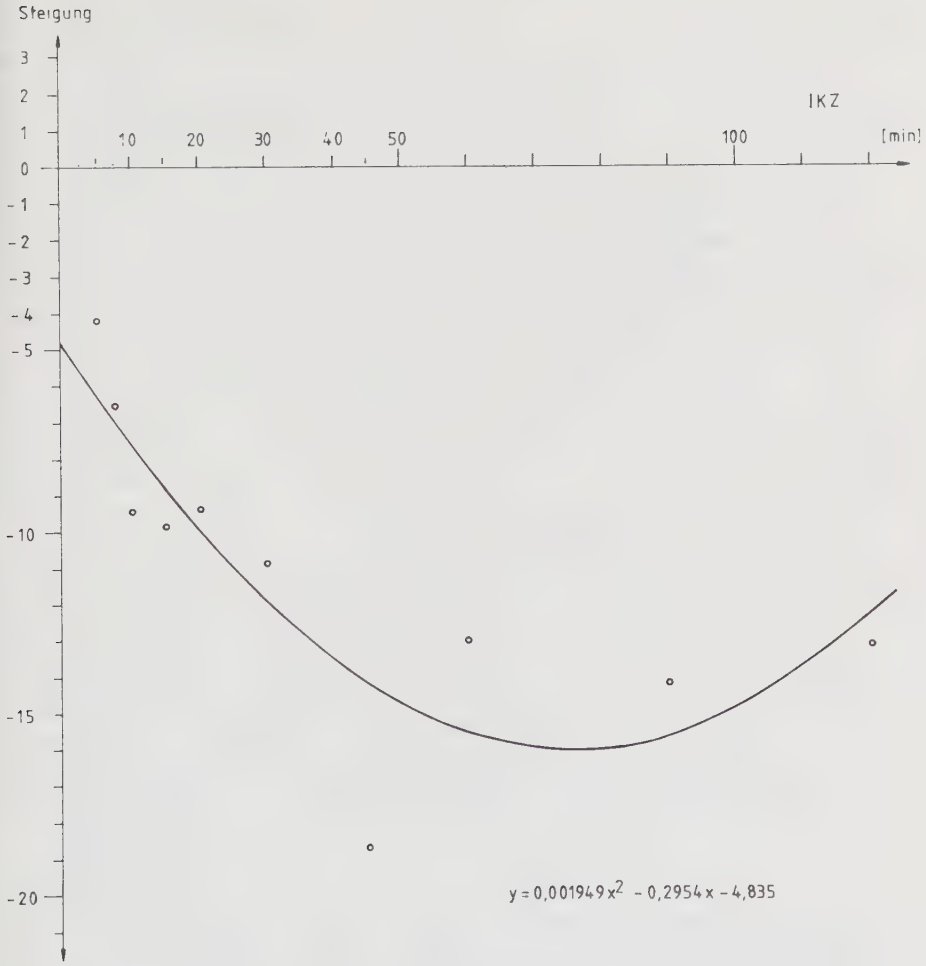


Abb. 27: Abhängigkeit der Steigung von Geraden, die in einem Koordinaten-System mit NE ^{51}Cr und E ^{51}Cr als Koordinaten sich als Regression der zu einer IKZ gehörenden Meßergebnisse verbindet (analog zu Abb. 2), von IKZ.
Punkte: Wertepaare
Kurvenzug: Polynom 2. Grades zur Beschreibung der Korrelation. Weitere Erläuterung siehe Text.

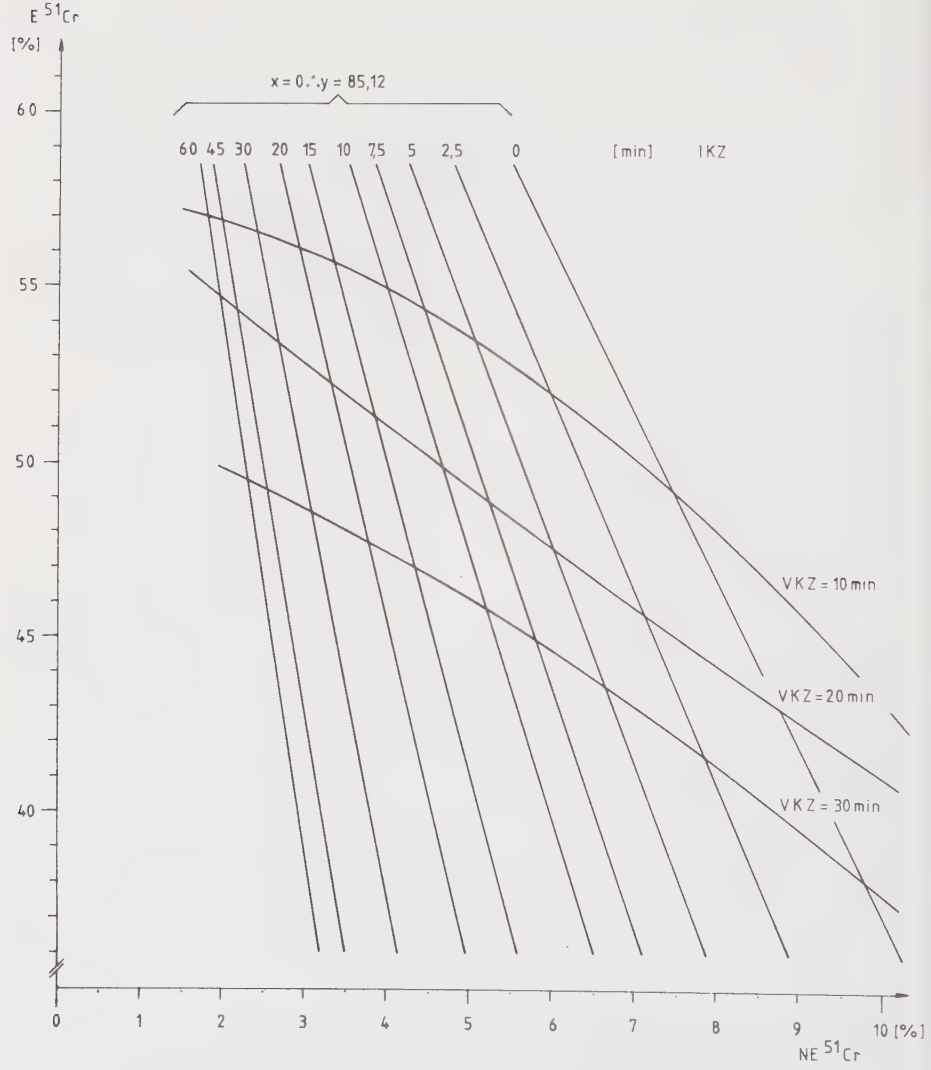


Abb. 28: Nomogramm zur Abschätzung von E ^{51}Cr und NE ^{51}Cr in Abhängigkeit von VKZ und IKZ. Erläuterung des Konstruktionsprinzips siehe Text.

6. Zusammenfassung

^{51}Cr-markierte Erythrocyten sind für Blutvolumen- und Erythrocytenlebenszeit-Bestimmungen bei vielen klinischen und wissenschaftlichen Fragestellungen sehr bedeutsam. Deshalb wurden der Markierungsmethode zahlreiche Untersuchungen gewidmet. Die Anzahl der publizierten Markierungsempfehlungen spiegelt aber gleichzeitig die Komplexität des Markierungsvorganges wider.
Gray und Sterling fanden 1950, daß Radiochrom in der Oxidationsstufe +6 als Chromat-Ion $^{51}CrO_4^{2-}$ durch die Erythrocytenmembran diffundiert, intrazellulär zum Chrom(III)-Ion reduziert und fest an das Hämoglobin gebunden wird. Das in Form des kinetisch inerten Hexaaqua-Komplexes vorliegende Chrom(III)-Ion $Cr(H_2O)_6^{3+}$ soll nicht in der Lage sein, die Zellmembran zu durchdringen. Der Verlauf und das Reduktionsmittel für die Reduktion des Chroms in den Erythrocyten aus der Oxidationsstufe +6 in die Stufe +3 sind noch weitgehend unbekannt. Die einschlägige Literatur beschreibt übereinstimmend, daß das nicht erythrocytengebundene Chrom (NE ^{51}Cr) in reduzierter Form und an Plasmaproteine gebunden vorliegt. Lediglich H.A.E. Schmidt hat nachgewiesen, daß bei Verwendung ACD-stabilisierten Vollblutes ein kleiner Anteil des Radiochroms in Form von Chrom-Citrat-Komplexen gebunden wird.

Die Standardverfahren zur Markierung haben den erheblichen Nachteil, daß durch zeitlich und technisch aufwendiges Waschen das nicht erythrocytär gebundene Chrom entfernt werden muß. 1963 brachte die Ionenaustauscher-Schnellmethode (Signette-Verfahren)nach Kuni den Vorteil, im geschlossenen System und mit geringerer mechanischer Beanspruchung das NE ^{51}Cr zu entfernen.
Neben der Ausbeute an markierten Erythrocyten stellt die Reinheit der injektionsfertigen Erythrocytensuspension von nicht erythrocytengebundener Aktivität (dem NE ^{51}Cr) ein wesentliches Gütekriterium der Markierung dar. Die vorliegende Arbeit geht dem speziellen Problem des NE ^{51}Cr bei Anwendung des Signette-Verfahrens nach.

Zur Bestimmung des NE ^{51}Cr wurde eine eigene Methode unter sorgfältiger Beachtung meßgeometrischer und gerätetechnischer Voraussetzungen, die nach der Literatur nicht uneingeschränkt geläufig zu sein scheinen, entwickelt. Substrate und Produkte der Markierung wurden zeitlich-dynamisch, quantitativ und qualitativ verfolgt. Neben den Hauptvariablen der Markierung, der Vorkontaktzeit (VKZ: Kontaktzeit zwischen Natriumchromat und ACD vor Erythrocytenzugabe) und der Inkubationszeit (IKZ: Zeit des Kontaktes von Erythrocyten und ^{51}Cr) wurden als Einflußgrößen untersucht: Hämolyse, spezifische Aktivität und Lagerzeit des ^{51}Cr, ACD-Puffer (pH und Puffermenge), Zusatz von Ascorbinsäure oder Aminosäuren, Tageszeit der Blutentnahme, Lagerung bis zur Reinjektion, Vollblut- und Seruminkubation.
Zur Komponentenanalyse des NE ^{51}Cr wurden folgende Komponententrennungsverfahren angewandt: Elektrophorese, Ultrafiltration durch Vakuum-Dialyse, äthanolische Fällung, Anionenaustauscher-Chromatographie, Analogrechner-Analyse und in-vivo-Verhalten.
Dabei fanden wir:

1) Die handelsübliche spezifische Aktivität zwischen 100 und 200 mCi/mg bewirkt wesentlich höhere NE ^{51}Cr-Werte und eine stärkere Abhängigkeit von der spezifischen Aktivität als die optimale spezifische Aktivität von 10 mCi/mg. Durch Nichtbeachtung dieser Sonderbedingung wurden in der Literatur beliebige NE ^{51}Cr-Werte erreicht.

2) Zwischen Lagerzeit der Chromatlösung und dem NE ^{51}Cr besteht kein signifikanter Zusammenhang.

3) Bei steigender VKZ nimmt das NE ^{51}Cr zu. Im praktischen Gebrauch sollte die VKZ so kurz wie möglich gehalten werden, allerdings ist eine Reduktion des Chromat-Ions auch bei Verkürzung auf eine virtuelle VKZ von 0 min nicht auszuschalten. Eine Zunahme der VKZ von 0 auf 10 min bewirkt eine Zunahme des NE ^{51}Cr von nur 0,5 %.

4) Bei der empfohlenen Puffermenge liegt unter dem damit erzielten pH-Wert ein breites Optimum vor. Erst außerhalb von pH-Werten zwischen 6,1 und 6,6 in der Inkubationsspritze wird das NE ^{51}Cr erhöht. Auch der Einfluß extremer klinischer pH-Situationen dürfte damit vernachlässigbar sein.

5) Der Markierungszeitverlauf zeigt, daß die Chromat-Ionen in vernachlässigbar kurzer Zeit (maximal 2,5 min) in die Erythrocyten diffundieren. Die IKZ ist von wesentlichem Einfluß auf die Bildung von geladenen und/oder neutralen Chrom(III)-Citrat-Komplexen, die in die Erythrocyten diffundieren und in den Erythrocyten das Chrom-Ion an andere Bindungspartner verlieren, so daß die Aktivität die Erythrocyten nicht mehr verlassen kann, während die Citrat-Ionen selbst aber zurückdiffundieren können. Unabhängig von der VKZ nimmt das NE ^{51}Cr mit der IKZ ab. Nach der empfohlenen IKZ von 7 min nimmt das NE ^{51}Cr wesentlich langsamer ab als zuvor, so daß eine weitere Verlängerung der IKZ keine wesentliche Qualitätsverbesserung bewirkt.

6) Das NE ^{51}Cr besteht wahrscheinlich aus mehreren Chrom(III)-Citrat-Komplexen und proteingebunden Chrom(III)-Ionen (und praktisch keinem Chromat). Die anionischen Chrom-Citrat-Komplexe sind ionenaustauschbar und überwiegen quantitativ bei weitem gegenüber neutralen und möglicherweise bestehenden kationischen Komplexen. Nach den Ergebnissen der Vakuum-Dialyse und äthanolischer Fällung muß offensichtlich die in der Literatur diskutierte Annahme, nach der das reduzierte Chrom praktisch in völliger, wenn auch lockerer Proteinbindung vorliegt, revidiert werden. Ca. 10 % der nicht dialysierbaren Aktivität kann ausgefällt werden.
Am Analogrechner ergab sich lediglich bei einem kompletten Verzweigungsmodell Angleich an die experimentellen Werte. Es zeigte sich dabei, daß das Chrom(III)-Ion in mindestens drei weitere nichtaustauschbare Substanzen übergehen kann, wobei die Konzentration der ersten Substanz mit zunehmender IKZ zugunsten der beiden

weiteren Substanzen abnimmt. Die dynamischen Veränderungen bei zwei dieser Substanzen sind mit dem Verhalten des leicht und fester proteingebundenen Chrom vergleichbar.

7) Das in-vivo-Verhalten des NE ^{51}Cr ergibt ebenfalls, das es aus mindestens zwei Komponenten besteht. 2/3 der Aktivitätskonzentration verweilen im Blut mit einer Halbwertszeit von mehr als 24 Stunden. Innerhalb der üblicherweise für Blutvolumenbestimmungen verwendeten Durchmischungszeit bis zu einer Stunde wird das NE ^{51}Cr also beispielsweise bei einem Wert von 3 % nur um etwa 1 % beeinflußt.

8) Reduzierenden Substanzen im Blut kommt nur unter extremen Bedingungen eine gewisse Bedeutung zu, wobei z.B. nach einer i.v. Dosis von 2,5 g L-Ascorbinsäure das NE ^{51}Cr innerhalb von 30 min auf etwa das doppelte (ca. 5 %) des Ausgangswertes rasch abfällt. Reduzierende Aminosäuren haben keinen sicheren Effekt. Hier ist anzumerken, daß wir ohne Medikation reproduzierbare intraindividuelle Schwankungen im Tagesablauf von ca. 1 % fanden.

Es wurde ein Nomogramm erarbeitet, aus dem sich für eine gegebene VKZ und IKZ das resultierende erythrocytengebundene ^{51}Chrom (E ^{51}Cr = das Radiochrom, das im Endprodukt des Markierungsvorganges als erythrocytengebundene Aktivität vorliegt) und das NE ^{51}Cr abschätzen läßt.
Bei den in der Routine üblichen Markierungsbedingungen (VKZ 10 min, IKZ 77 min) sind NE ^{51}Cr-Werte von etwa 2,5 % zu erwarten.

Seite

7. Verzeichnis der Abbildungen

1. Abhängigkeit des NE ^{51}Cr von IKZ und VKZ. 12

2. Zusammenhang zwischen NAT ^{51}Cr und NE ^{51}Cr nach verschiedenen VKZ. 13

3. Abhängigkeit des E ^{51}Cr (berechnet aus den in Tab. 1 und Abb. 1 gezeigten experimentellen Werten) von IKZ und VKZ. 14

4. (oben): Abhängigkeit der Differenz zwischen den E ^{51}Cr-Werten bei IKZ von 2,5 min bis 20 min und dem maximalen E ^{51}Cr-Wert von der IKZ.
(unten): Rückextrapolation von E $^{51}Cr_o$ und E $^{51}Cr_{max}$ für VKZ 0 min. 15

5. Abhängigkeit des NAT ^{51}Cr von IKZ bei VKZ 10 min. 18

6. Erläuterung der spektralen Extinktionsmessung des freien Hämoglobins in Drabkin-Lösung. 20

7. Abhängigkeit der Aktivität gespülter Inkubationsspritzen von VKZ vor und nach einer IKZ von 20 min. 24

8. Abhängigkeit des NAT ^{51}Cr von VKZ (IKZ jeweils 20 min) für eine spezifische Aktivität des ^{51}Cr von 10 mCi/mg (als Metall) sowie von 226 mCi/mg Cr. 26

Seite

9. Abhängigkeit des NE ^{51}Cr von VKZ (IKZ jeweils 20 min) für spezifische Aktivitäten von 120 und 226 mCi/mg Cr sowie für 10 mCi/mg. 27

10. Detailzeichnung aus Abb. 9. 28

11. Abhängigkeit des NE ^{51}Cr vom Gewicht des ACD-Puffers in der Inkubationsspritze. 31

12. Zusammenhang zwischen NE ^{51}Cr und dem pH-Wert in der Inkubationsspritze während der IKZ wie er aus Variation der Puffermenge resultiert. 32

13. Abhängigkeit des NAT ^{51}Cr von der Dosis und der Zeitlatenz einer L-Ascorbinsäure-Medikation. 36

14. Abhängigkeit des NE ^{51}Cr von der Dosis und der Zeitlatenz einer L-Ascorbinsäure-Medikation. 37

15. Verlauf des NE ^{51}Cr nach oraler Applikation von Aminosäuren-Gemischen. Oben: drei Aminosäuren mit Applikation um 12 Uhr. Unten: Aminofusin ® 500 ml um 14 Uhr. 38

16. Abhängigkeit des NE ^{51}Cr von der Tageszeit der Blutentnahme an drei verschiedenen Tagen. 40

17. Aktivitätsrückstand nach Vakuumdialyse in Abhängigkeit von der IKZ. 46

18. Aktivitätsverlauf im IAT-Schlauch. 50

Seite

19. Wie Abb. 18, jedoch mit Zuordnung zum gemessenen NE ^{51}Cr. 51

20. Aktivitätsverlauf im IAT-Schlauch. Zusätzlich Aktivitätsverläufe nach Injektion von 2,5 g L-Ascorbinsäure. 52

21. Aktivitätsverlauf im IAT-Schlauch bei Passage der Dialysat-Flüssigkeit aus Versuch 4.2.1.2 54

22. Schaltung des Analog-Rechners für ein Kettenmodell (Modell I). 55

23. Wie Abb. 22, jedoch mit zusätzlicher Verzweigung (Modell II). 56

24. Wie Abb. 22, jedoch ausschließlich verzweigtes Modell (Modell III). 57

25. Spannungsverläufe im Modell III mit den in Abb. 24 angegebenen Einstellwerten. 58

26. Aktivitätsverlauf nach i.v.-Injektion von ^{51}Cr-markiertem Serum bei 4 Probanten. 61

27. Abhängigkeit der Steigung von Geraden, die in einem Koordinaten-System mit NE ^{51}Cr und E ^{51}Cr als Koordinaten sich als Regression der zu einer IKZ gehörenden Meßergebnisse verbindet (analog zu Abb. 2), von IKZ. 83

28. Nomogramm zur Abschätzung von E ^{51}Cr und NE ^{51}Cr in Abhängigkeit von VKZ und IKZ. 84

Seite

8. Verzeichnis der Tabellen

1. Abhängigkeit des NAT ^{51}Cr von IKZ und VKZ. 10

2. Abhängigkeit des NAT ^{51}Cr von VKZ bei IKZ 10 min. 17

3. Konzentrationen des freien Hämoglobins in mg/dl unter verschiedenen Versuchsbedingungen. 22

4. NAT ^{51}Cr und NE ^{51}Cr in Abhängigkeit von der Lagerzeit. 29

5. Abhängigkeit des pH-Wertes während der IKZ vom Gewicht des ACD-Puffers. 30

6. pH-Werte während der Markierungsabschnitte. 33

7. Abhängigkeit des NAT ^{51}Cr und des NE ^{51}Cr von VKZ bei IKZ 20 min bei Verwendung eines Puffers ohne Glukose. 34

8. Ergebnis der Faktorenanalyse für die Abhängigkeit des NE ^{51}Cr von der Tageszeit. 39

9. Einfluß der Lagerzeit nach IAT-Passage bis zur Reinjektion auf das NE ^{51}Cr. 41

10. Aktivitätsverteilung im Acetat-Gel-Streifen nach Elektrophorese mit 10 min Laufzeit bei 140 V. 43

11. Aktivitätsverteilung, wie Tab. 10, jedoch mit 30 min Laufzeit. 44

Seite

12. Aktivitätsverteilung, wie Tab. 10, jedoch mit 30 min Laufzeit und Abhängigkeit von der IKZ. 45

13. Aktivitätsrückstand nach äthanolischer Fällung in Abhängigkeit von IKZ. 47

14. Charakteristika der Komponenten bei graphischer Zerlegung des Aktivitätsverlaufes im IAT-Schlauch von Abb. 20 in Exponentialfunktionen. 49

15. Verteilungsräume nach i.v.-Injektion von unter Ascorbinsäure-Zusatz ^{51}Cr-markiertem Serum. 60

9. Literaturverzeichnis

1. Albert, C.A., Eceleston, H.N., Rafil, A., Hunter, C.H., Henley, E.E., Albert, S.N.:
A rapid method for preparing washed red cells with chromium-51
J. Lab. Clin. Med. 54 (1959) 300

2. Albert, S.N., Albert, C.A.:
Blood volume methodology
Scintillator 9 (5 - C) (1965) Aug. 15

3. Ashby, W.:
Blood volume II. A comparison between total blood volumes determined by plasma volume methods and by a new corpuscle volume method
Arch. intern. Med. 35 (1925) 632

4. Bock, H.E., Graul, E.H., Gelinsky, P., Hundeshagen, H., Kaufmann, W., Klinke, H., Nieth, H.:
Blutvolumen- und Erythrocyten-Überlebenszeitbestimmung mit Hilfe von ^{51}Cr-markierten Erythrocyten
Strahlentherapie 115 (1961) 163

5. Chambers jr., F.W.:
A Technique for the Simultaneous Determination of Red Cell Mass and Plasma Volume Using Radioactive Chromium and Jodine
Atompraxis 5 (1959) 256

6. Chaplin jr., H., Mollison, P.L., Vetter, H.:
The body/venous hematocrit ratio: its constancy over a wide hematocrit range
J. Clin. Invest. 32 (1953) 1309

7. Chernoff, A.J.:
Chromium-51 Tagging of the α -Chaim of Human Haemoglobin
Nature 192 (1961) 327

8. Cohen, H.A.:
Chromium Jellification Reaction in Normal and Pathological Human Sera
Lancet 19 (1965) 1302

9. Cooper, M., Stroebel, Ch.F., Stickney, J.M., Owen jr.,Ch.A.:
Radiochromium in the study of red cell survival and gastrointestinal bleeding
Fed. Proc. 14 (1955) 31

10. Cooper, M., Owen jr., Ch.:
Labeling human erythrocytes with radiochromium
J. Lab. Lin. Med. 47 (1956) 65

11. Crawford, H., de Gruchy, G.C.:
The use of radioactive chromium in clinical medicine
Med. 7. Australia (1958) 657

12. Cunningham, T.A., McGirr, E.M., Clement, W.E.:
The effect of prior contact between acid citrate dextrose and sodium radio chromate solutions on the efficiency with ^{51}Cr labeled red cells
J. Lab. Clin. Med. 50 (1957) 778

13. Doikos, G.K., Kontras, D.A.:
Radiochrom zur Bestimmung der Blutvolumenveränderungen
Schweiz. med. Wschr. 89 (1959) 1108

14. Danon, D., Morikowsky, Y., Gasko, O.:
51-Chromium uptake as a function of red cell age
J. Lab. Clin. Med. 67 (1966) 70

15. Dawson, A.B., Evans, H.M., Whipple, G.H.:
Blood volume studies. III. Behavior of a large series of dyes introduced into the circulating blood
Amer. J. Physiol. 51 (1920) 232

16. Degkwitz, E.:
Zur Ascorbinsäure-Substitution beim Menschen
Dtsch. med. Wschr. 97 (1972) 811

17. Donuhue, D.M., Motulsky, A.G., Giblett, E.R.,
Pirzio-Bivoli, G., Viranuvatti, V., Finh, C.A.:
The use of chromium as a red-cell tag
Brit. J. Haemat. 1 (1955) 249

18. Ebaugh jr., F.G., Ross, J.F., Emerson, C.P.:
The use of chromium-51 as an erythrocyte tagging agent for determining the survival of transfused and autotransfused erythrocytes
J. Clin. Invest. 32 (1953) 563

19. Ebaugh jr., F.G., Clemens, T., Rodnan, G., Peterson,R.E.:
Quantitative measurement of gastrointestinal blood loss
Amer. J. Med. 25 (1958) 169

20. Eisenberg, S.:
Blood volume in patients with laennec's cirrhosis of the liver as determined by radioactive chromium-tagged red cells
Amer. J. Med. 20 (1956) 189

21. Fine, J., Seligman, A.M.:
Traumatic shock. VII. A study of the problem of the "lost plasma" in hemorrhagic, Tourniquet, and burn shock by the use of radioactive iodoplasma protein
J. Clin. Invest. 23 (1944) 720

22. Frank, H., Gray, S.J.:
Determination of plasma volume in man with radioactive chromic chloride
J. Clin. Invest. 32 (1953) 991

23. Fudenberg, H., Baldini, M., Mahoney, J.P., Dameshek, W.:
The body hematocrit/venous hematocrit ratio and the "splenic reservoir"
Blood 17 (1961) 71

24. Gehler, J., Kübler, W.:
Verteilungsstudien mit intravenös infundierter Ascorbinsäure
Internat. Z. Vit. Forschung 40 (1970) 454

25. Gehrmann, G.:
Untersuchungen mit radioaktivem Chrom bei hämolytischen Anämien
Dtsch. Med. Wschr. 25 (1960) 1097

26. Gelinsky, P.:
Anwendung von Radiochrom (Blutvolumen und Erythrocytenlebensdauer) und Radioeisen (Eisenstoffwechsel und Erythropoese) in der Hämatologie. Untersuchungen zur Anämie bei Rheumatismus mit der kombinierten Radioisotopendiagnostik
Inaugural-Dissertation, Marburg 1966

27. Gibson, J.G., Evans, W.A.:
Clinical studies of the blood volume. I. Clinical application of a method emplaying the Azo Dye "Evans Blue" and the spektrophotometer
J. Clin. Invest. 16 (1937) 301

28. Gibson, J.G., Evans, W.A.:
Clinical studies of the blood volume. II. The relation of plasma and total blood volume to venous pressure, blood velocity rate, physical measurements, age and sex in ninety normal humans
J. Clin. Invest. 16 (1937) 317

29. Gibson, J.G., Seligman, A.M., Peacock, W.C., Aub, J.C., Fine, J., Evans, R.D.:
The distribution of red cells and plasma in large and minute vessels of the normal dog, determined by radioactive isotopes of iron and iodine
J. Clin. Invest. 25 (1946) 848

30. Giebel, O.:
Zur Problematik der Blutvolumenbestimmung mit Hilfe von Radioisotopen
Der Anaesthesist 15 (1966) 173

31. Glocker, R., Machevauch, E.:
Röntgen- und Kernphysik
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1971

32. Grable, E., Willians, J.A.:
Simplified method for simultaneous determination of plasma volume and red-cell mass with ^{125}J-labeled albumin and ^{51}Cr-tagged red cells
J. Nucl. Med. 9 (1968) 219

33. Gray, S.J., Sterling, K.:
The Tagging of Red Cells and Plasma Proteins with Radioactive Chromium
J. Clin. Invest. 29 (1950) 1604

34. Gray, S.J., Frank, H.:
The simultaneous determination of red cell mass and plasma volume in man with radioactive sodium chromate and chromic chloride
J. Clin. Invest. 29 (1950) 1614

35. Gray, S.J., Sterling, K.:
Determination of circulating red cell volume by radioactive chromium
Science, Vol. 112 (1950) 179

36. Gray, S.J., Frank, H.:
The simultaneous determination of red cell mass and plasma volume in man with radioactive sodium chromate and chromic chloride
J. Clin. Invest. 32 (1953) 1000

37. Gregersen, M.I., Rawson, R.A.:
Blood Volume
Physiol. Rev. 39 (1959) 307

38. Hahn, L., Hevesy, G.:
A method of blood volume determination
Acta physiol. scand. 1 (1940) 3

39. Hahn, L., Balfour, W.M., Ross, J.F., Bale, W.F., Whipple, G.H.:
Red cell volume circulating and total as determined by radio iron
Science 93 (1941) 87

40. Hall, Ch. A.:
Erythrocyte dynamics in liver disease
Am. J. Med. 28 (1960) 541

41. Heath, M.L., Vickers, M.D., Dunlop, D.:
A Simple Method for Simultaneous Determination of Plasma and Red Cell Volume
Brit. J. Anaesth. 41 (1969) 669

42. Heinrich, H.C., Gabbe, E.E., Meineke, B., Becker, K.:
Stoffwechselverhalten der ^{51}Cr-Markierung im menschlichen Körper nach intravenöser Injektion von $^{51}Cr^{+++}$
Med. Welt 16 (1966) 835

43. Hellman, L., Burns, J.J.:
Metabolism of L-Ascorbic Acid-1-C^{14} in Man
J. biol. Chem. 230 (1958) 923

44. Hevesy, G., Nylin, G.:
Application of K-42 labeled red corpuscles in blood volume measurements
Acta physiol. scand. 24 (1952) 285

45. Höfer, R. (Hrsg.):
Nierenclearance
Schriftenreihe "Nuklearmedizin" der Farbwerke Hoechst, Frankfurt/Main 1968

46. Höfer, R., Schatz, H., Thumb, N.:
(^{51}Cr) Albumin. Biochemical and Metabolic Studies
Clin. Chim. Acta 22 (1968) 135

47. Hollemann, A.F., Wiberg, E.:
Lehrbuch der anorganischen Chemie, Walter de Gruyter u. Co., Berlin (1960) 508

48. Hoye, R.C.:
Simultaneous measurement of red cell, plasma, and extracellular fluid volume in the surgical patient
J. Lab. and Clin. Med., April (1967)

49. Hughes Jones, N.C., Mollison, P.L.:
The interpretation of measurements with ^{51}Cr-labeled red cells
Clin. Sc. 15 (1956) 207

50. Hughes Jones, N.C., Szur, L.:
Determination of the sites of red cell destruction using ^{51}Cr-labeled cells
Brit. J. Haem. 3 (1957) 320

51. Hughes Jones, N.C.:
The uses and limitations of ^{51}Cr as a red cell label
IX. Int. Congr. Radiol. München 1959
G. Thieme, Urban und Schwarzenberg, München - Berlin, 1961, Vol. II, 914

52. Hundeshagen, H., Graul, E.H., Kaufmann, W., Schug, K.E.:
Vergleichende Untersuchungen der "in vivo" Überlebenszeit von Blutbestandteilen mit ^{51}Cr und ^{131}J
IX. Internat. Kongreß für Radiologie, München 1959
Urban und Schwarzenberg, München - Berlin, 1960

53. ICSH
Bericht des Internationalen Komitees für Standardisierung in der Hämatologie (ICSH), Expertengruppe für die hämatologische Diagnostik mit Radioisotopen
Standardmethoden für die Bestimmung des Erythrocyten- und Plasmavolumens
Blut, Bd. XXIX, (1974) 422

54. Jandl, J.H., Greenberg, M.S., Yonemoto, R.H., Castle, W.B.:
Clinical determination of the sites of red cell sequestration in hemolytic anemias
J. Clin. Invest. 35 (1956) 842

55. Keith, N.M., Rowntree, L.G., Geraghty, J.T.:
A method for the determination of plasma and blood volume
Arch. intern. Med. 16 (1915) 547

56. Knorre, W.A.:
Analog Computer in Biologie und Medizin
VEB Gustav Fischer Verlag Jena 1971

57. Kresser, M.:
Eine einfache und zuverlässige Methode zur Bestimmung des freien Hämoglobins im Plasma
Das deutsche Gesundheitswesen 22 (1967) 2270

58. Kübler, W., Gehler, J.:
Zur Kinetik der enteralen Ascorbinsäure-Resorption
Ein Beitrag zur Berechnung nicht dosisproportionaler Resorptionsvorgänge
Internat. Z. Vit. Forschung 40 (1970) 442

59. Kühn, A., Reinhardt, M.:
Eiweißkapital und Plasmavolumen bei Hämoblastosen
Med. Klin. 61 (1966) 248

60. Kulakova, E.F.:
Chromium tartrates and citrates
Trudy Dagestank. Sel'skokhoz. Inst. 11 (1959) 274

61. Kuni, H.:
Ein Beitrag zur Radioisotopendiagnostik: Hämatologische Untersuchungen mit ^{51}Cr und ^{59}Fe
Inauguraldissertation, Marburg 1963

62. Kuni, H., Graul, E.H., Hundeshagen, H., Schaumlöffel, E.:
Eine Methode zur Schnellmarkierung der Erythrozyten mit ^{51}Cr
Atompraxis 9 (1963) 377

63. Kuni, H., Graul, E.H.:
Die Methode der Clearance-Untersuchung mit ^{51}Cr-EDTA im abfallenden Plasmaspiegel
Atompraxis 13 (1967) 8

64. Ledlie, E.M., Vassar, P.S.:
^{51}Cr estimations of red cell volume on patients with polycythemia vera
Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung, Bd.2 (1956)52

65. Malcolm, D., Ranney, H.M., Jakobs, A.S.:
Association of radioactive chromium with various components of hemoglobin
Blood 21 (1963) 8

66. Mayer, K., Ley, A.B., D'Amaro, J.:
Impairment of Red Cell Viability by Exposure to "Excess" Acid-Citrate Dextrose
Blood 28 (1966) 513

67. McCall, M., Keller, S.:
An abbreviated method for blood volume measurement employing radiochromium
J. Lab. Clin. Med. 55 (1960) 149

68. McClellan, J.E., Donegan, Ch., Thorup, O.A., Leavell, B.S.:
Survial time of the erythrocyte in myxedeme and hyperthyroidism
J. Lab. Clin. Med. 51 (1958) 91

69. McIntyre:
Radioactive tracers in hematologic disease I
Hospital Practice March 1972, 99

70. McKenzie, A., Tindle, J.:
Determination of plasma volume using intravenous iron dextran
Lancet I (1959) 333

71. Mollison, P.L., Veall, N.:
The use of isotope ^{51}Cr as a label for red cells
Brit. J. Haemat. 1 (1955) 62

72. Mollison, P.L., Robinson, M., Hunter, D.:
Improved method for labelling red cells with radioactive phosphorus
Lancet 1 (1958) 766

73. Muenker, G.:
Redoxpotential-, Eisen-, Kupfer- und Vit. C-Veränderungen im Blut unter einer Behandlung, die Einfluß auf das redoxaktive Geschehen nimmt
Inaugural-Dissertation, Freiburg (1962)

74. Mundschenk, H., Fischer, J.:
Beiträge zur Kinetik der Erythrocytenmarkierung mit ^{51}Cr
Radio-Isotope in der Hämatologie
I. Int. Symposion, Freiburg i. Br. 1962
Nuclear-Medizin, Suppl. 1 ad Vol. II. 1963, 173

75. Myhre, E., Rustad, H.:
Blood Volume Determination with ^{51}Cr-labeled Red Cells
Acta Chir.Scand.125 (1963) 197

76. Necheles, T.F., Weinstein, J.M., Le Roy, G.V.:
Radioactive sodium chromate for the study of survial of red blood cells. I: The effect of radioactive sodium chromate on red cells
J. Lab. and Clin. Med. 42 (1953) 358

77. Owen jr., Ch.A., Bollmann, L., Grindley, H.:
Radiochromium-labeled Erythrocytes for the Detection of Gastrointestinal Hemorrhage
J. Lab. and Clin. Med. August 1954, 238

78. Parthasorathy, A., Ramaswamy, D., Nayudamma, Y., Ramanujam, V.V.:
Chromium complexes. Citrate and tartrate complexes
Leather Sci. (Madras, India) 11 (1) (1964) 1-5

79. Pearson, H.A., Vertrees, K.M.:
The binding of chromium^{51} by haemoglobin
Nature (Lond.) 189 (1961) 1019

80. Pribilla, W., Ernst, W., Röttgen, W.:
Hämolytische Untersuchungen mit radioaktivem Chrom
Klin. Wschr. 37 (1959) 23

81. Read, R.C., Wilson, G.W., Gardner, F.H.:
The use of radioactive sodium chromate to evaluate the life span of the red blood cell in health and in certain hematologic disorders
Amer. J. Med. Sc. 40 (1954) 228

82. Read, R.C.:
Studies of red-cell volume and turnover using radiochromium: Description of a new "closed" method of red cell volume measurement
New. Engl. J. Med. 250 (1954) 1021

83. Richterich, R.:
Klinische Chemie
Akadem. Verlagsgesellschaft Frankfurt a.M. 1965, 289

84. Rosen, P.J., Eyre, H.J., Perry, S.:
Radioisotope Labels for the study of Leukocyte Kinetics. Part II
Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol. XVI, (1971) 752

85. Schloesser, L.L., Korst, D.R., Clatanoff, D.V., Schilling, R.F.:
Radioactivity over the liver and spleen following the transfusion of chromium-^{51}-labeled erythrocytes in hemolytic anemia
J. Clin. Invest. 36 (1957) 1470

86. Schmidt, H.A.E., Schmidt, H., Keiderling, W., Matthes, M., Feiser, W.:
Die Radiochromierung als Wertigkeitsbestimmung von Blutkonserven. I. Mitt.: Der Einbau von $Na_2\,{}^{51}Cr\,O_4$ in frische und gelagerte Erythrocyten
Acta haemat. (Basel) 23 (1960) 96

87. Schmidt, H.A.E., Hoffmann, G.:
Die Bedeutung von Ödemen für die Bestimmung des Blutvolumens
Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung, Bd. IV
München-Berlin: Urban und Schwarzenberg 1960

88. Schmidt, H.A.E.:
Methodische und klinische Untersuchungen zur Bestimmung der Blutvolumina mit nuklearmedizinischen Verfahren
Habilitationsschrift Freiburg 1966

89. Schmidt, H.A.E.:
Das Blutvolumen
Ergebnisse Inn. Med. u. Kinderheilk. 27 N.F. (1968) 155

90. Schreiner, B.F., Murphy, G.W., Glick, G., Yu, P.N.:
Effect of exercise on the pulmonary blood volume in patients with acquired heart disease
Circulation 27 (1963) 559

91. Seifert, J., Meßmer, K.:
Factors Influencing the ^{51}Cr-labeling of Erythrocytes
Europ. surg. Res. 2 (1970) 321

92. Sjöstrand, T.:
A method for the determination of the total hemoglobin content of the body
Acta physiol. scand. 16 (1948) 211

93. Small, W.J., Verloop, M.C.:
Determination of the blood volume using radioactive ^{51}Cr: modifications of the original technique
J. Lab. clin. Med. 47 (1956) 255

94. Smolik, E.A., Muether, R.O., Nash, F.P., Tala, P., Konneker, W.:
Radioisotopes in a simplified technic for accurate determination of blood volumes
Amer. J. Clin. Path. 26 (1956) 1127

95. Sterling, K., Gray, S.J.:
Determination of the Circulating Red Cell Volume in Man by Radioactive Chromium
J. Clin. Invest. 29 (1950) 1614

96. Stohlman jr., F., Schneiderman, M.A.:
Application of the ^{51}Cr-technique to the study of experimental hemolysis in the dog
J. Lab. Clin. Med. 47 (1956) 72

97. Strumia, M.M., Taylor, L., Sample, A.B., Collwell, L.S., Dugan, A.:
Uses and limitations of survival studies of erythrocytes tagged with ^{51}Cr
Blood 10 (1955) 429

98. Sutherland, D.A., McCall, M.S., Groves, M.T., Muirhead, E.E.:
The survival of human erythrocytes estimated by means of cells tagged with radioactive chromium: a study of the normal state
J. Lab. Clin. Med. 43 (1954) 717

99. Suzuki, F., Shoemaker, W.C., Baker, R.J., Caray, J.S.:
Use of labeled red cells and low viscosity dextran in the study of trapped blood
Surgery, Gynecology a. Obstetrics 121 (1965) 51

100. Tripathy, K.K., Patnaik, R.K.:
Citrate complex of chromium
J. Indian Chem. Soc. 43 (12) (1966) 772 Eng.

101. Vérel, D.:
Simultaneous measurements of plasma volume with Dextran and Evans blue. Evidence for increased vascular permeability in oedema and infection
Clin. Sci. 17 (1958) 639

102. Vullo, C., Tunioli, A.M.:
Survival studies of thalassemic erythrocytes transfused into donors into subjects with thalassemia minor and into normal and splenectomiced subjects
Blood 13 (1958) 803

103. Weinstein, I.M., LeRoy, G.V.:
Radioactive sodium chromate for the study of survival of red blood cells
II. The rate of hemolysis in certain hematologic disorders
J. Lab. Clin. Med. 42 (1963) 368

104. Wollheim, E., Becker, G., Schneider, K.W.:
Die Bestimmung der aktiven Blutmenge mittels Evans Blue, radioaktivem P^{32} und Cr^{51}
Klin. Wschr. 36 (1958) 800

105. Wood, G.A., Levitts, S.H.:
Simultaneous red cell and plasma volume determination using 51-Cr tagged red cells and 125-J-labeled albumin
J. nucl. Med. 6 (1965) 433

106. Ziegler, E.:
Messung und Bedeutung des Redoxpotentials im Blut in vivo und in vitro
Editio Cantor / Aulendorf in Württ. (1960)

Herrn Prof.Dr.med.Dr.rer.nat.E.H.Graul danke ich für die Möglichkeit, in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin arbeiten zu dürfen sowie für die Bereitstellung des benötigten Instrumentariums und Materials.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr.med.H.Kuni für die Themenstellung und seine großzügige Hilfe bei dessen Lösung. Sein nicht versiegender Ideenreichtum und sein unermeßliches Wissen waren mir beispiellose Unterstützung.

Herrn Prof.Dr.phil.H.Klamberg danke ich für sein ständiges Interesse an der Arbeit, seine wertvollen Anregungen und seine bereitwillige Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse.

Lebenslauf

Am 9. Juli 1942 wurde ich als Sohn des Studiendirektors i.R. Reinhold Schmidt und seiner Ehefrau Marta Schmidt, geb. Niestädt, in Kolberg/Ostseebad geboren. Nach vierjähriger Grundschulzeit besuchte ich von 1953 bis 1956 die Goetheschule und von 1956 bis 1962 die Wilhelmschule in Kassel. Nach dem Abitur begann ich mit dem SS 1962 mein Medizinstudium in Marburg, wo ich 1964 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und 1966 die ärztliche Vorprüfung ablegte. Das WS 1966 war ich an der Leopold-Franzens-Universität in Innsbruck inskribiert. Ab SS 1967 studierte ich wieder in Marburg und legte hier 1971 das Staatsexamen ab. Vom Sommer 1971 bis Frühjahr 1973 arbeitete ich als Medizinalassistent bei einem Arzt für Allgemeinmedizin, in der Chirurgischen Klinik und in der Medizinischen Klinik der Philipps-Universität Marburg. Am 1. März 1973 erhielt ich die Approbation als Arzt und begann meine Tätigkeit als wissenschaftlicher Angestellter in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin. Während dieser Zeit habe ich an der vorliegenden Dissertation gearbeitet.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten

in Marburg: Beckmann, Berendes, Bommer, Brück, Buchholz, Cleve, Dimroth, Dittrich, Dölle, Drawert, Exner, Friederich, Gedigk, Golenhofen, Graul, Hamm, Hardewig, Hensel, Herrmann, Heuser, Hildebrandt, Hohorst, Hort, Jacob, Karlson, Klingenberg, Koransky, Korb, Lang, Linneweh, Mahr, Mann, Martini, Marx, Mattes, du Mesnil de Rochemont, Niessing, Nocke, Petry, Pots, Rohen, Rodeck, Salfeld, Sauer, Schleyer, Schlosser, Schmid, Schrappe, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Solcher, Spiegelberg, Staib, Straub, Vogt, Walcher, Wendt, Witzel, Würtele, Zilliken

in Innsbruck: Baumgartner, Berger, Braunsteiner, Ganner, Gögl, Halhuber, Heinz, Holzer, Huber, Kirchmair, Konrad, Konzett, Ruckensteiner, Schinzel, Tapfer.